

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-201582

(43) Date of publication of application : 05.09.1987

(51)Int.Cl.

C12N 15/00

C12N 1/20

G12P 21/00

// (C12N 1/20

C12R 1:19)

(C12P 21/00)

C12R 1:19)

(21)Application number : 61-043531

(71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO

TEIJIN LTD

(22)Date of filing : 28.02.1986

(72)Inventor : HORIKOSHI KOKI

KUDO TOSHIAKI

KITAI KAZUO

NAKAMURA SATOSHI

(54) PRODUCTION OF NOVEL PLASMID, MICROBIAL CELL AND HUMAN IMMUNOGLOBULIN G FC FRAGMENT PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the secretion of globulin G by a periplasm of *E.coli*, by introducing a DNA region coding Fc fragment of human immunoglobulin G into a plasmid together with four kinds of other specific DNA regions and transforming *E.coli* with the produced plasmid.

CONSTITUTION: A DNA region coding an Fc fragment protein of human immunoglobulin G (A DNA region coding the polypeptide corresponding to the region from 32nd to the 254th of the amino acid sequence shown in the figure) is introduced into a plasmid together with a DNA region containing (A) a DNA region having promoter function to control the expression of said protein and (B) a DNA region coding a signal peptide and a DNA fragment containing (C) a DNA region imparting a host cell with an activity to promote extracellular secretion (preferably originated from plasmid PMB9) and (D) a DNA region having a promoter function to control the expression of the above DNA region. *E.coli* is transformed with the plasmid prepared by the above process. The DNA regions (A), (B) and (D) are preferably originated from alkalophilic *Bacillus* No.170 strain.

[illegible][illegible]

⑪ 公開特許公報(A)

昭62-201582

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)9月5日

C 12 N 15/00

7115-4B

1/20

7115-4B

C 12 P 21/00

6712-4B

//C 12 N 1/20

C 12 P 1:19

(C 12 P 21/00

C 12 R 1:19)

審査請求 未請求 発明の数 3 (全38頁)

⑭ 発明の名称 新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリン G F c 領域蛋白質の製造法

⑮ 特 願 昭61-43531

⑯ 出 願 昭61(1986)2月28日

⑰ 発 明 者 堀 越 弘 毅 東京都練馬区桜台4-39-8

⑱ 発 明 者 工 藤 俊 章 東京都目黒区平町1-21-20-606

⑲ 発 明 者 北 井 一 男 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内

⑳ 発 明 者 中 村 聡 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内

㉑ 出 願 人 理 化 学 研 究 所 和光市広沢2番1号

㉒ 出 願 人 帝 人 株 式 会 社 大阪市東区南本町1丁目11番地

㉓ 代 理 人 弁理士 有我 軍一郎

明 細 書

NA 領域を少なくとも含むことを特徴とする第1項記載のプラスミド。

1. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリン G F c 領域蛋白質の製造法

2. 特許請求の範囲

(i) ヒト免疫グロブリン G F c 領域蛋白質をコードする DNA 領域、核蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域及びシグナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び

ii) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域を有する DNA 断片、を含むプラスミド。

(ii) ヒト免疫グロブリン G F c 領域蛋白質をコードする DNA 領域が、第1図に示されたアミノ酸配列の32番目 (Thr) から254 番目 (Lys) までによって示されたポリペプチドをコードする D

(第1項 i) におけるプロモーター機能を有する DNA 領域が、好アルカリ性バチルス (Bacillus) №170 株の染色体 DNA 由来であることを特徴とする第1項記載のプラスミド。

(4) シグナルペプチドをコードする DNA 領域が、好アルカリ性バチルス (Bacillus) №170株の染色体 DNA 由来であることを特徴とする第1項記載のプラスミド。

(5) 実質的に菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域が、プラスミド pMB9 由来であることを特徴とする第1項記載のプラスミド。

(6) 第1項 ii) におけるプロモーター機能を有する DNA 領域が、好アルカリ性バチルス (Bacillus) №170 株の染色体 DNA 由来であることを特徴とする第1項記載のプラスミド。

(7) プラスミド pEXFC10である第1項記載のプラスミド。

- (8) プラスミド pEXFC100 である第1項記載のプラスミド。
- (9 i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質をコードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域及びシグナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び
- ii) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域を有する DNA 断片、を含むプラスミドによって形質転換された組換え微生物細胞。
- 09 該微生物細胞がエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属することを特徴とする第9項記載の微生物細胞。
- 09 該微生物細胞がエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) H B101 株であることを特徴とする第9項記載の微生物細胞。
- 02 i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質を

コードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域及びシグナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び

ii) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域を有する DNA 断片、を含むプラスミドによって形質転換された組換え微生物を、菌体外にヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質が生成・蓄積するまで培養を行ない、培養物からヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質を採取することを特徴とするヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質の製造法。

03 該微生物がエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属することを特徴とする第12項記載の製造法。

00 該微生物がエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) H B101 株であることを特徴とする第12項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(1) 技術分野

本発明はヒト免疫グロブリン G (以下「Ig G」と略すこともある) Fc 領域蛋白質コードする DNA 断片を有する新規組換えプラスミド、該プラスミドにより形質転換された新規組換え微生物細胞、及び該微生物を用いたヒト Ig G Fc 領域蛋白質の菌体外分泌による製造方法に関する。

(2) 発明の背景

すべての脊椎動物の体液中に存在し、抗原と特異的に結合する能力を有する蛋白質が抗体であり、抗体蛋白質と構造的、機能的関連をもつ蛋白質は総称して免疫グロブリンといわれている。免疫グロブリン (以下「Ig」と略すことがある) は、物理化学的あるいは免疫学的な性状から、Ig G、Ig A、Ig M、Ig E、Ig D の5つのクラスに分類される。

なかでも Ig G は細菌やウイルスに対する生体防御に重要な役割を持っており、従来より、ヒト Ig G を多量に含む γ-グロブリン画分をヒトの血液より分離し、一部変性することにより重症患

者のための免疫剤として用いられてきた。しかしながら、これは原料を人血に依存しており、その大量の安定した入手が困難であること、またそのために均質で安全なものを常時得にくいという難点があった。そこでヒト免疫グロブリンを遺伝子操作技術によって産出することができれば、医薬品製造のために極めて有利であることは論を待たない。

さて、ヒト Ig G は2本の H 鎖 (heavy chain) と2本の L 鎖 (light chain) がジスルフィド結合で結ばれた形をとる。ヒト Ig G 分子にバビリンなどの蛋白質分解酵素を作用させると分子中央で切断され、抗原結合活性のある断片 (F a b 領域蛋白質) と、抗原結合活性はなく条件により結晶化しやすい断片 (F c 領域蛋白質) とに分かれる。F a b 領域蛋白質は L 鎖全体と H 鎖のアミノ末端側の半分を含み、1分子の Ig G から2分子の F a b 領域蛋白質が生じる。一方、H 鎖のカルボキシル末端側の半分である F c 領域蛋白質は、ヒンジ (h)、C_H 2、C_H 3 の3つの部位より成り、

ヒンジ部位において2本の鎖がジスルフィド結合によって結ばれている。そして、Fc領域蛋白質はエフェクター(effector)機能を有している。従来、 γ -グロブリン製剤は、無(低) γ -グロブリン血症への補充、ウイルス感染症の予防と治療と、等に適用されてきた。近年、 γ -グロブリン製剤が特発性血小板減少性紫斑病(ITP)治療に有効であり(P. Imbachら, Lancet, 1, 1228(1981))、特にそのFc領域が重要であることが示唆されている(村ら, 臨床免疫, 15 (Supp 1, 7) 76(1983))。また、全身性エリテマトーデス(SLE)等における腎糸球体抗原免疫複合体が、ヒトIgG Fc領域蛋白質の添加により融解したという報告もある(河住ら, 臨床免疫, 16, 240(1984))。以上のように、Fc領域蛋白質は、ITPやSLEのような自己免疫疾患の治療薬として用いることができる可能性があるが、作用機序などを含めて不明な点が多い。十分な量のFc領域蛋白質を供給できないことが、この理由の1つとなっている。

端に20~40残基程度のアミノ酸からなるシグナルペプチドといわれるものがついた状態で産生され、細胞膜を透過して分泌される時にシグナルペプチダーゼという酵素によってシグナル領域が切断されて、蛋白質が外に分泌される。この機構は基本的に高等生物でも微生物でも同様に考えられ、本来分泌されない蛋白質にシグナルペプチドをつけてやることによって、細胞膜を透過させることも可能なのである。

大腸菌(*Escherichia coli*)は、その周囲を内膜・外膜という二つの膜で囲まれており、内膜と外膜との間にはペリプラズムと呼ばれる空間が存在する。従って、シグナルペプチドを用いることにより内膜を通過した蛋白質は、外膜を通過できないためペリプラズムに蓄積してしまうことになるため、大腸菌における本来の意味での菌体外分泌を考えた場合、シグナルペプチドのみでは不十分である。

近年、本発明者らの一部は、プラスミドベクターpMB9(R.L. Rodriguezら, Molecular Mech

近年の遺伝子操作技術の発達により、種々の有用蛋白質の微生物等を用いた生産が可能になった。しかしながら、通常、有用蛋白質は主として菌体内に蓄積されるものであり、所望の有用蛋白質を菌体外に分泌する微生物は限られたものしか知られていない。有用蛋白質を微生物菌体内に産生させた場合には菌体体積を越える生産量は期待できないが、菌体外に分泌させれば有用蛋白質の、より多量の生産が可能になる。また、宿主微生物に対してtoxicな有用蛋白質や、菌体内プロテアーゼに高感受性な有用蛋白質の生産においても、菌体外分泌が有利である。さらに、一般に分泌性蛋白質の種類はそれほど多くないため、有用蛋白質を菌体外に分泌させればその精製工程の簡略化が期待でき、工業的にみてコストダウンがはかれる。以上の理由により、所望の有用蛋白質を生産し、菌体外に分泌するような微生物を任意に創製することができれば、その産業上の利用性は極めて大きい。

一般に菌体外に分泌される蛋白質は、アミノ末

anisms in the Control of Gene Expression, ICN-UCLA, symp. Mol. Cell. Biol. (ed. D. P. Nierlichら), V, 471, Academic Press Inc., New York (1976))を用い、好アルカリ性バチルス(*Bacillus*)N170株(FERM BP-467)由来の染色体DNAより、ベニシリナーゼ遺伝子の大腸菌によるクローン化に成功した(T. Kudoら, J. Bacteriol., 156, 949(1983))。

この際に、ベニシリナーゼ蛋白質の大腸菌菌体外への分泌が見られ、pMB9プラスミド上に存在するプロモーターを持たない*Kil*遺伝子、好アルカリ性バチルスN170株由来のDNA断片中のベニシリナーゼ遺伝子近傍に存在するプロモーター活性を有する領域(*Bx*プロモーター)により活性化させることにより、大腸菌外膜の透過性が增大していることが明らかとなった(堀越, 現代化学, 176, 56(1985))。

そこで、本発明者らは、この菌体外分泌に関する研究を更に進めた結果、ヒトIgG Fc領域蛋白質の菌体外分泌発現に成功し、本発明を完成

するに至ったものである。

(3) 発明の目的

本発明の目的は、ヒト IgG Fc 領域蛋白質をコードする DNA を含む DNA 断片及びその断片が組み込まれた新規組換えプラスミドを提供することにある。

本発明の他の目的は、上記新規組換えプラスミドによって形質転換され、目的とするヒト IgG Fc 領域蛋白質を、菌体外に産生し得る新規組換え微生物細胞を提供することにある。本発明の更に他の目的は、該微生物細胞を用いてヒト IgG Fc 領域蛋白質を菌体外分泌生産させる方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、以下の説明により一層明らかになるであろう。

(4) 発明の構成

本発明者の研究によれば、前記本発明の目的は、

i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質をコードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域、及びシ

グナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び、

ii) 実質的に菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域、及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域、

を有する DNA 断片を含むプラスミド、そのプラスミドによって形質転換された微生物細胞及びその微生物細胞を用いてヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質を菌体外分泌生産させる方法を提供することによって達成されることがわかった。

以下、本発明について更に詳細に説明する。

〔ヒト免疫グロブリン G Fc 領域遺伝子のクローニング〕

ヒト IgG を産生する細胞、たとえばヒト骨髓腫細胞 ARH77 株 [K.H. Burk ら, J. Cancer Res., 38, 2508 (1978)] を、適当な条件下、たとえば 37℃、炭酸ガス濃度 5% で培養増殖させ、得られた細胞を遠心分離によって集める。この細胞を、たとえばラウリル硫酸ナトリウム (SDS) のよう

な界面活性剤存在下で、たとえばプロテアーゼ K のような蛋白質分解酵素を用いて溶解させる。さらに、たとえばフェノールによる抽出によって除蛋白質を行ない、ヒト染色体 DNA を得る。

こうして得られた DNA を、例えば EcoRI のような制限酵素で切断し、適当なファージ・ベクター、たとえばシャロン 4 A ベクター (P.R. Blattner ら, Science, 196, 161 (1977)) と連結した後、イン・ビトロ・パッケージング (A. Becker ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581 (1975)) を行ない、ヒトの遺伝子ライブラリーを得る。EcoRI 以外の制限酵素を用いる場合や、クローニングサイトとして EcoRI をもたないような他のファージ・ベクターを使用する場合には、適当なリンカー DNA を用いれば遺伝子ライブラリーの作成が可能になる。

この遺伝子ライブラリーのファージを、たとえばエシェリヒア・コリ L E392 株 (ATCC 33572) に感染、プラークを形成させ、たとえばプラーク・ハイブリダイゼーション法 (W.D. Benton ら,

Science, 196, 180 (1977)) によって目的クローンの選択を行なう。プローブとしては、たとえばニックトランスレーション法 (P.W.J. Rigby ら, J. Mol. Biol., 113, 237 (1977)) により ³²P 標識を行なったヒト免疫グロブリン H 鎖 J 領域 (Fab 領域の中の一部であり、抗原結合活性を有する可変部とエフェクター機能を有する定常部との境界に存在) 遺伝子や、あるいはヒト IgG Fc 領域蛋白質のアミノ酸配列に対応すると考えられる塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを化学合成した後、これを ³²P 標識したものをを用いることができる。

このプラーク・ハイブリダイゼーションによって陽性を示したクローンの制限酵素切断点地図を作成し、ヒト染色体由来の DNA 断片を、たとえば pBR322 (F. Bolivar ら, Gene, 2, 95 (1977)) のようなプラスミド・ベクターにサブクローニングする。得られたサブクローンの挿入部分の DNA 塩基配列を、たとえばマキサム・ギルバート法 (A.M. Maxam ら, Methods Enzymol., 65, 499

(1980))あるいはM13ファージを用いたジデオキシ・チェーン・ターミネーション法(J. Messingら, *Nucleic Acids Res.*, 9, 309(1981))の方法により決定し、ヒトIgG Fc領域遺伝子の存在を確認する。第1図に、ヒトIgG Fc領域蛋白質のアミノ酸配列及びそれをコードするDNA塩基配列の一例を示す。

こうして得られたヒトIgG Fc領域遺伝子は、ヒト染色体のものであるから、実際にアミノ酸をコードしないイントロン(intron)を含んでおり、このままでは微生物中で発現させることはできない。そこでこのFc領域遺伝子を適当な制限酵素で切断し、イントロンの部分を完全に除去する。この制限酵素切断の際に、実際にアミノ酸をコードするエクソン(exon)の部分も削られてしまうことがありうるが、その場合には化学合成したオリゴヌクレオチドのジョイントを用いて削られた部分を修復させると共に、隣り合ったエクソン同志を連結させる。同時に、合成オリゴヌクレオチドを用いた同様な手法により、Fc領域

遺伝子の3'末端に読みとりフレームを一致させるように翻訳終止コドン(TGA, TAG, TAA)を2つ以上タンデムに連結し、発現効率の向上をはかることもできる。ここで得られたイントロンのないFc領域遺伝子は、やはり合成オリゴヌクレオチドを用いた手法を用い、その上流に読みとりフレームを一致させるように翻訳開始コドンを与与することができる。さらにこのFc領域遺伝子は、適当なプロモーター、SD(シャイン・ダルガーノ)配列の下流につなぐことにより、菌体内発現型遺伝子とすることができる。使用可能なプロモーターとして、トリプトファン・オペロン・プロモーター(trpプロモーター)、ラクトース・オペロン・プロモーター(lacプロモーター)、tacプロモーター、P_Lプロモーター、lppプロモーター等あげられるが、とりわけtrpプロモーターやtacプロモーターが好適である。Fc領域遺伝子を効率良く発現させるためには、プロモーター、SD配列、翻訳開始コドン、翻訳終止コドンのすべてを連結したものが好まし

く、プロモーター、SD配列、翻訳開始コドン、Fc領域遺伝子及び翻訳終止コドンが、この順序で連結したものがとりわけ好ましい。

本発明の菌体内発現型ヒトIgG Fc領域遺伝子を、適当なプラスミド・ベクター、たとえばpBR322に挿入することにより、発現型プラスミドが作成できる。菌体内発現型プラスミドとして、好ましくは、pPC203、pPC211、pPC361、pPC362が用いられる。

《好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ遺伝子のクローン化》

ベニシリナーゼ生産能を有する好アルカリ性バチルス№170株(FERM BP-467)を適当な条件下、たとえば30℃で振とう培養し、得られた菌体を遠心分離によって集める。この菌体から、公知の方法、たとえばフェノール法によってDNAを抽出し、染色体DNAを得る。

こうして得られたDNAを、たとえばEcoRIのような制限酵素で部分的に切断し、適当なプラスミドベクター、たとえばpMB9プラスミド

のEcoRIサイトへの挿入を行ない、好アルカリ性バチルス№170株染色体DNAを組み込んだ組換えプラスミドを得る。この組換えプラスミドを、たとえばエシェリヒア・コリHB101株(ATCC 33694)に公知の方法、たとえばCaCl₂法(M.V. Norgardら, *Gene*, 3, 279(1978))を用いて導入、アンピシリン及びテトラサイクリンに耐性の形質転換株をスクリーニングすることにより、好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ遺伝子及びベニシリナーゼの菌体外分泌生産に關する情報を有するDNA領域を有する組換えプラスミド、たとえばpEAP1を得る。

得られた組換えプラスミドのDNA塩基配列を、たとえば前記マキサム・ギルバート法あるいは前記M13ファージを用いたジデオキシ・チェーン・ターミネーション法により決定し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域、シグナルペプチド領域、成熟ペプチド領域の構造、さらにベニシリナーゼの菌体外分泌に關する好アルカリ性バチルス№170株由来のE_xプロモーター領域及びpM

B 9 プラスミド由来の K i l 遺伝子の構造を明らかにする。第 1 図に、好アルカリ性バチルス № 170 株ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域の DNA 塩基配列を示す。また、第 2 図にプラスミド p M B 9 由来の K i l 遺伝子の DNA 塩基配列を、第 3 図に好アルカリ性バチルス № 170 株由来の E x プロモーター領域の DNA 塩基配列を、それぞれ示す。さらに、シグナルペプチド領域及び K i l 遺伝子については、対応するアミノ酸配列も合わせて示す。

このベニシリナーゼ遺伝子及びベニシリナーゼの菌体外分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域を有する組換えプラスミドを出発材料として、自然欠失を利用した方法、あるいは S 1 -ヌクレアーゼ、DNA -ポリメラーゼ等の修飾酵素や合成オリゴヌクレオチドを用いる人為的方法により、好アルカリ性バチルス № 170 株由来の E x プロモーター領域とプラスミド p M B 9 由来の K i l 遺伝子から成る菌体外分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域全域、及びベニシリナーゼ遺伝子の

全域あるいは一部を含む、組換えプラスミドが得られる。このようなプラスミドとして、好ましくは p E A P 3、p E A P 6、p E A P 7、p E A P 7 Δ H、p E A P 7 Δ C C H、p E A P 7 Δ C H、p E A P 8、p 329 E X K が用いられる。

また、上述のベニシリナーゼ遺伝子及びベニシリナーゼの菌体外分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域を有する組換えプラスミドを、適当な制限酵素で切断し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む DNA 断片を得る。この DNA 断片を、必要なら適当な合成オリゴヌクレオチド・リンカーを介して、適当なプラスミドベクター、たとえば p C M 1 (T. J. Close と R. Rodriguez, Gene, 20, 305 (1982)) と p C M 7 (T. J. Close と R. Rodriguez, Gene, 20, 305 (1982)) とのハイブリッド・プラスミド p C M 71 にクローン化し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドが得られる。ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプ

ラスミドとして、好ましくは p P S 1、p P S 1 Δ H、p 329 P S が用いられる。

〈分泌型プラスミドの作成〉

前に得られたヒト I g G F c 領域菌体内発現型プラスミド、たとえば p F C 362 を、適当な制限酵素で切断することにより、菌体内発現のためのプロモーター領域を削除し、その部分に適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域、たとえば好アルカリ性バチルス № 170 株ベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域との連結用の合成オリゴヌクレオチド・ジョイントを挿入した形のプラスミドを得る。このようなプラスミドとして、好ましくは p S E C - F C、p S E C - F C が用いられる。

次にこのプラスミドに、適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドを適当な制限酵素で切断することにより得られる適当なプロモーター領域を有する DNA 断片及びシグナルペプチド領域を有する DNA 断片を挿入し、適当なプロモーター領域及びシグナルペプチ

D 領域下流にヒト I g G F c 領域遺伝子が連結した形のプラスミドが得られる。このようなプロモーター領域・シグナルペプチド領域を有する遺伝子としては、大腸菌 β-ラクタマーゼ遺伝子、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子、大腸菌リポプロテイン遺伝子、枯草菌ベニシリナーゼ遺伝子、枯草菌プロテアーゼ遺伝子、酵母 α 因子遺伝子、好アルカリ性バチルス № 170 株ベニシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性エアロモナス (Aeromonas) № 212 株キシナーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルス № N⁻ 4 株セルラーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルス № 1139 株セルラーゼ遺伝子等があげられるが、好ましくは好アルカリ性バチルス № 170 株ベニシリナーゼ遺伝子が用いられる。適当なプロモーター領域、適当なシグナルペプチド領域及びヒト I g G F c 領域遺伝子が、この順序に連結された形のプラスミドが最も好ましく、このプラスミドを用いることにより、ヒト I g G F c 領域蛋白質のペリプラズムまでの分泌が可能になる。このようなペリプラズム分泌発現型プラ

スミドとして、好ましくはpP5-Fcが用いられる。

さらに前記の各種プラスミドを組み合わせることで、適当なプロモーター領域・シグナルペプチド領域下流にヒトIgG Fc領域遺伝子を連結したDNA領域、及び好アルカリ性バチルス№170株由来のExプロモーター領域とpMB9プラスミド由来のKil遺伝子から成る菌体外分泌生産に関与する情報を担うDNA領域とを合わせ持つようなプラスミドが得られる。このプラスミドを用いることにより、ヒトIgG Fc領域蛋白質の菌体外分泌が可能になる。このような菌体外分泌発現型プラスミドとして、好ましくはpEXFC10、pEXFC100が用いられる。

なお、本発明において適当なプロモーター領域、シグナルペプチド領域、ヒトIgG Fc領域遺伝子、Exプロモーター領域及びKil遺伝子は、これらと生物学的機能において同等なDNA領域、すなわち該DNA領域に対してスクレオチドの置換、スクレオチドの欠失、スクレオチドの挿入及

びスクレオチド配列の逆位その他の突然変異によって関連づけられているDNA領域でもよいことはいうまでもない。

(ヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質の生産)

かくして得られた、ヒトIgG Fc領域遺伝子菌体内発現型プラスミド、ペリプラズム分泌発現型プラスミド及び菌体外分泌型プラスミドを常法により適当な宿主に導入して組換え微生物を得、これを培養することにより、ヒトIgG Fc領域蛋白質を生産させることができる。このような宿主としてはエシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物を有利に使用することができる。宿主としては、前記のエシェリヒア・コリHB101株、同C600株、同DPS-upF株、同x1776株、同LE392株等、通常のこの種の技術分野で用いられる微生物が有利に用いられる。なかでも、エシェリヒア・コリHB101株及び同C600株がとりわけ好ましい。

このようにして得られた組換え微生物を、それ自体は公知の方法で培養する。培地としては、ヒ

トIgG Fc領域蛋白質の生産に適した培地であって、かつ宿主微生物の生育に適した培地を用い得るが、たとえばM9培地(T.Maniasら編、Molecular Cloning P440(Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982))、LB培地(T.Maniasら編、Molecular Cloning, P440(Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982))、BPB培地(Difco 製)、Nutrient寒天培地等を基本培地として調製したものを用いればよい。その他、必要に応じて、炭素源窒素源の他にアミノ酸、ビタミン等の栄養素を添加してもよいし、発現型プラスミドの宿主内安定化のために適当量の抗生物質等を添加してもよい。

培養は、pH、温度、酸素供給量を目的の組換え微生物に適した条件で行なう。菌体内発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、プロモーターを効率良く機能させる目的で、イソプロピル-γ-D-チオガラクトシド等の薬剤を加えることもできる。菌体外分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、該微

生物が生育してその菌体量が最大に達したとき、即ち対数増殖後期から培地中にFc領域蛋白質が生成、蓄積するまでの時間中、同一培地で培養をそのまま継続するのがよい。たとえばエシェリヒア属の微生物の前記菌体量が最大に達したときから培地中にFc領域蛋白質の生成、蓄積が停止するまでの時間は、ほぼ12~48時間の範囲である。なお、pH条件は特に影響されないが、pH5~8の範囲、特にpH7が適当である。また、ペリプラズム分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養についても、菌体外分泌型プラスミドを有する組換え微生物と同様な方法で行なうことができる。

培養後、たとえばオスモティック・ショック法(C.Katoら、E.J.Appl.Microbiol.Biotechnol., 18, 339(1983))を用いて、培養物を菌体内画分、ペリプラズム画分及び菌体外画分に分離する。各画分におけるヒトIgG Fc領域蛋白質の有無は、たとえば市販のウサギ抗ヒトIgG-Fc成分抗血清及び酵素標識抗ウサギIgG抗体を用いた

エンザイム・イムノアッセイ (EIA) により確認できる。

本発明において、アミノ酸、ペプチド、核酸、その他に関し略号で表示する場合、それらはIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づいて表示され、例えば下記の略号が使用される。なお、アミノ酸などに関し光学異性体がある得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

Cys: システイン
Met: メチオニン
Glu: グルタミン酸
Asp: アスパラギン酸
Lys: リジン
Ala: アルギニン
His: ヒスチジン
Phe: フェニルアラニン
Tyr: チロシン
Trp: トリプトファン

Pro: プロリン
Asn: アスパラギン
Gln: グルタミン
Gly: グリシン
Ala: アラニン
Val: バリン
Leu: ロイシン
Ile: イソロイシン
Ser: セリン
Thr: スレオニン
DNA: デオキシリボ核酸
A: アデニン
T: チミン
G: グアニン
C: シトシン
EDTA: エチレンジアミン四酢酸
SDS: ドデシル硫酸ナトリウム

以下実施例を掲げて本発明について詳細に説明するが、本発明は何らこれにより限定されるものではない。

実施例1 (ヒト染色体DNAの単離)

ヒト骨髓腫細胞ARH77株 3×10^6 個をガラス棒でつぶし、2% SDS存在下、プロテアーゼK(シグマ)で処理した後、TEバッファー(10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA)で飽和したフェノールを加えた。遠心分離により水相とフェノール相を分離し(フェノール抽出)、水相をTEバッファー(20 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、5 mM EDTA)に対して透析した。リボヌクレアーゼA(シグマ)処理をし、再度フェノール抽出を行なった後、TEバッファーに対して透析し、ヒト染色体DNA約1.2 μ gを取得した。[N. Blinら, Nucleic Acids Res., 3, 2303(1976)参照]。

実施例2 (ヒト遺伝子ライブラリーの作成)

実施例1で得られたヒト染色体DNA150 μ gを後述する実施例4に示した方法に準じて制限酵素EcoRI(宝酒造)で部分分解した後、蔗糖密度勾配遠心(蔗糖10~40% (wt/vol)、28000

r.p.m. \times 15時間、20℃)を行ない、15Kbp~23Kbpに相当するDNA断片4.3 μ gを得た。次にこのDNA断片0.8 μ gとシャロン4Aベクターとの連結を行い、シャロン4Aベクターの右のアームと左のアームの間にヒト由来のDNAが挿入されたハイブリッドDNAを得た。連結にはT4-DNAリガーゼ(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ)を用い、連結反応は66 mM Tris-HCl (pH7.6)、6.6 mM MgCl₂、10 mMジチオスレイトール、1 mM ATP水溶液中で、11℃、12時間行なった。得られたハイブリッドDNAについて、イン・ビトロ・パッケージングを行ない、ヒト遺伝子ライブラリー(1.8 \times 10⁶ P.F.U./ μ g、ヒト染色体DNAの99%以上を含む)とした。

実施例3 (ヒト免疫グロブリンC遺伝子のスクリーニング)

前記実施例2で得られたヒト由来のDNAを含むシャロン4Aファージの集合(遺伝子ライブラリー)をエシェリヒア・コリL E 392株に感染さ

せ、ブランクを形成させた。ヒト抗体遺伝子を含むクローンは、ブランク・ハイブリダイゼーション法により、 ^{32}P - 標識ヒト免疫グロブリン G H 鎖 J 遺伝子で選択した。ヒト Ig G 遺伝子を含むシャロン 4 A ファージからの DNA の調製は、Thomas らの方法 (M. Thomas Jr., J. Mol. Biol., 91, 315 (1974) 参照) により行なった。

実施例 4 (制限酵素切断地図の作成)

実施例 3 で得られたヒト Ig G 遺伝子を含むシャロン 4 A DNA 1 μg を制限酵素切断用バッファー [EcoRI, HpaI, HinfI, TaqI, XbaI, XhoI 切断では 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 100 mM NaCl - 10 mM MgSO₄ 水溶液を、AccII, BamHI, ClaI, HindIII, PstI, RsaI, Sau3AI 切断では 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 60 mM NaCl - 7 mM MgCl₂ 水溶液を、Bali, BstNI, NaeI, SstII 切断では 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 10 mM MgSO₄ -

1 mM ジチオスレイトール水溶液を、そして Sau3AI 切断では 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) - 20 mM KCl - 7 mM MgCl₂ - 7 mM 2-メルカプトエタノール水溶液を、それぞれ用いた。) 20 μg に溶解させ、制限酵素 (BstNI, ClaI, NaeI はニューイングランド・バイオラブズ製、SstII はベセスグ・リサーチ・ラボラトリーズ製、RsaI, Sau3AI, TaqI はニッポン・ジーン製、それ以外は宝酒造製を用いた。) 2~4 ユニットを添加して、37℃、1 時間以上切断を行なった。制限酵素 BstNI 及び TaqI による切断は、60℃で 1 時間以上切断を行なった。なお、二種類の制限酵素による切断を行なう場合には、まず低塩濃度で作用する制限酵素で処理し、次に所定濃度まで塩濃度を上げてから、より高塩濃度で作用する制限酵素で処理した。

制限酵素による切断後、4 μg の 0.25% プロモフェノールブルー-50% グリセロール水溶液を加え、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 % ~

ブローニング)

ヒト Ig G 遺伝子を含むシャロン 4 A DNA 3 μg を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 HindIII で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) を行なった。ヒト Ig G Fc 領域遺伝子を含む約 8.2 Kbp の DNA の部分に相当するバンドを切出し、そのアガロースゲル断片を 3 倍量 (vol/wt) の 8 M NaClO₄ 水溶液に溶解させた。Chen らのグラスフィルター法 (C.W. Chen ら, Anal. Biochem., 101, 339 (1980)) により、約 8.2 Kbp の DNA 断片をアガロースゲルにより回収した。一方、大腸菌用プラスミド pBR322 1 μg を実施例 4 に準じて制限酵素 HindIII で切断したのに対して、アルカリ性ホスファターゼ (E.coli C75) (宝酒造) を 0.5 ユニット加えて、37℃で 1 時間反応させた。反応終了後、反応液中のアルカリ性ホスファターゼを失活・除去するために、フェノール抽出を 3 回繰返した。このようにして得られた pBR322 の HindIII - アルカリ性ホスファターゼ処理液を、ゲルより回収した約

2.5 %) を行なった。アガロースはシグマ社のタイプ II 電気泳動用を使用した。電気泳動バッファーとして、40 mM Tris-H₂COOH (pH 8.0) - 1 mM EDTA 水溶液を用いた。厚さ 2 mm の垂直ゲルにて、6~9 V/cm の電圧で 1.5~3 時間電気泳動を行なった。この電気泳動の際、DNA 断片の分子量マーカーとして、メファージの DNA を制限酵素 HindIII で切断したもの (ペーリンガー・マンハイム) を用いた。電気泳動終了後、アガロースゲル中の DNA を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイド水溶液で染色し、このゲルに対して長波長紫外線を照射して、切断パターンの観察を行なった。各種制限酵素単独による切断、及び二種の制限酵素の組合せによる切断、これらの切断パターンを解析することにより、第 4 図 (A) に示すような核制限酵素切断点の相対位置関係を決定した。第 4 図 (A) は Ig G 遺伝子を含むヒト染色体 DNA の制限酵素切断点地図を示す。

実施例 5 (ヒト免疫グロブリン G 遺伝子断片のサ

8.2 Kbp Hind III断片水溶液と混ぜ、エタノール沈殿の後、連結反応用バッファー（実施例2を参照）50 μ lに溶解させる。2ユニットのT4-DNAリガーゼを加え、11℃、12時間反応させて、連結反応を行なった。

エシェリヒア・コリC600株（ATCC 33525）の形質転換は、通常のCaCl₂法（M.V. No regardらの方法、前記）の改良法で行なった。すなわち、5mlのL培地（1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl、pH 7.2）に大腸菌C600株の18時間培養基を接種し、菌体を含む培養液の600nmにおける濁度（OD₆₀₀）0.3まで生育させる。菌体を冷たいマグネシウム・バッファー（0.1 M NaCl、5 mM MgCl₂、5 mM Tris-HCl（pH 7.6、0℃））中で2回洗い、2mlの冷やしたカルシウム・バッファー（100 mM CaCl₂、250 mM KCl、5 mM MgCl₂、5 mM Tris-HCl（pH 7.6、0℃））中に再懸濁させ、0℃で25分間放置する。次に菌体をこの容

量の1/10にカルシウム・バッファーの中で濃縮し、連結後のDNA水溶液と2:1（vol.:vol.）混合する。この混合物を60分間、0℃で保った後、1mlのLBG培地（1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl、0.08% グルコース、pH 7.2）を添加し、37℃で1時間振とう培養する。培養液を、選択培地（アンピシリン30 μ g/mlを含むL培地プレート）に100 μ l/プレートの割合で接種する。プレートを37℃で1晩培養して、形質転換株を生育させる。得られたアンピシリン耐性のコロニーより、公知の方法を用いてDNAを調製し、アガロースゲル電気泳動により、目的のサブクローンpTJ1B（約12.6 Kbp）を確認した。

前記実施例4の方法により作成した、このサブクローンの制限酵素切断点地図を第4図（B）に示した。この第4図（B）においてPst I-③からHind III-③の間に、Pst Iサイトが3〜4個存在することは確認したが、その位置についての確認は行っていない。

さらに、前記プラスミドpTJ1BのPst I-③→Pst I-④のDNA断片（約1.7 Kbp）を、pTJ1Bの場合とほぼ同様の手法により、プラスミドpBR322のPst Iサイトに挿入し、プラスミドpTJ5（約6.1 Kbp）を作成した。目的のクローンは、テトラサイクリン耐性の形質転換株の中から選択した。得られたサブクローンの制限酵素切断点地図を、第4図（C）に示した。

実施例6（ヒト免疫グロブリンG Fc領域遺伝子DNA塩基配列の決定）

ヒトIgG Fc領域遺伝子のDNA塩基配列は、マキサム・ギルバート法により決定した。

たとえば、前記実施例5において作成されたサブクローンpTJ5 DNA約50 μ gを実施例4の方法に準じてSma Iで切断する。得られたDNA断片をアルカリ性ホスファターゼで脱ホスホリ化し、ポリスクレオチドキナーゼ（P-Lバイオケミカルズ）5ユニットを用いて（ γ -³²P）-ATPで標識した。ポリスクレオチドキナ

ーゼ反応は50 mM Tris-HCl（pH 9.5）-10 mM MgCl₂-5 mM ジチオスレイトール水溶液中で行ない（ γ -³²P）-ATPはアマシャム製を100 μ Ci分用いた。³²P標識DNA断片をPst Iで切断した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）により目的のDNA断片を分離し、後述の実施例7の方法に従ってゲルからの抽出を行なった。得られた³²P標識-Sma I→Pst I断片について、各塩基特異的な部分分解反応を行ない、7 M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度8%〜23%）で分離した。2〜7日間、-80℃でオートラジオグラフィを行なった後、分解パターンの解析を行ない、Fc領域遺伝子の塩基配列決定のための資料とした。

一方、pTJ5をPst Iで切断した場合には、3'末端標識キット（アマシャム）を用いて、（ α -³²P）-ddATPによる標識を行なった。この³²P標識DNA断片をSma Iで切断した後、目的のDNA断片のポリアクリルアミドゲル電気

泳動(ゲル濃度5%)による分離・回収を行なった。得られた $PstI \rightarrow SmaI$ 断片についても、上記手順に従って解析を行ない、Fc領域遺伝子の塩基配列決定のための資料とした。

実施例7 (Fc領域C₃部位遺伝子のクローニング)

実施例5で得られたプラスミドpTJ5を、実施例4の方法に準じて制限酵素PstIを切断した後、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)を行ない、Fc領域遺伝子を含む約1.7 KbpのDNA断片を実施例5の方法でゲルより回収した。得られたDNA断片を、実施例4の方法で制限酵素NaeIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)を行なった。C₃部位遺伝子を含む約0.6 KbpのDNAの部分に相当するバンドを切断し、そのポリアクリルアミドゲル断片を細かく破砕した後、2~5mMの溶出用バッファー(500 mM NH₄OC, 1 mM EDTA, 0.1% SDS (pH7.5))を加え、

37℃で一晩振とうした。遠心分離により、目的のDNAを含む水相の回収を行なった。さらに得られたDNA断片を、実施例4の方法で制限酵素RsaIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)の後、C₃部位を含む約310bpのDNA断片を、上記と同様な方法により、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

こうして得られたC₃部位遺伝子を含む約310bpのRsaI \rightarrow NaeIのDNA断片を、実施例5の方法に準じてプラスミドpBR322のBamHIサイトに挿入し、C₃部位遺伝子の読みとり方向がプラスミドpBR322中のテトラサイクリン耐性遺伝子の読みとり方向と一致する方向(第5図において時計まわりの方向)に挿入されたプラスミドpFC70(約4.7 Kbp)を作成した。pFC70作成の方法を第5図に示した。

実施例8 (Fc領域C₂部位遺伝子とC₃部位遺伝子の連結)

実施例7で得られた、Fc領域遺伝子を含む約1.7 KbpのDNA断片を、実施例4の方法に準じ

て制限酵素Sau3AI及びTaqIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)の後、C₂部位遺伝子を含む約240bpのDNA断片約0.5 μ gを、実施例7の方法に準じて、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

C₂部位とC₃部位の連結部分に相当する、第6図記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチドを、上の鎖と下の鎖とに分けて化学合成した。オリゴヌクレオチドの合成は金自動DNA合成機(アプライド・バイオシステムズ、モデル380A)を用いて、ホスホアミダイト法により行なった。すなわち、合成オリゴヌクレオチドを含むアンモニア水溶液を55℃で一晩保つことにより、DNA塩基の保護基をはずし、セファデックスG-50ファイン・ゲル(ファルマシア)を用いたゲル濾過によって、高分子量の合成オリゴヌクレオチド画分を分取する。ついで、7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃

度20%)の後、紫外線シャドウイング法により泳動パターンの観察を行ない、目的とする大きさのバンド部分を切出して、実施例7の方法に準じて合成オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルより回収した。最後に合成オリゴヌクレオチドを含む溶液をゲル濾過カラム(セファデックスG-50)にかけることにより、合成オリゴヌクレオチドの精製品を得た。なお、必要に応じて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を繰り返し、合成オリゴヌクレオチドの純度の向上をはかった。このようにして得られた合成オリゴヌクレオチド精製物0.1~1.0 μ gを、実施例6の方法に準じて、1 mM ATP存在下でオリゴヌクレオチドキナーゼ反応を行ない、5'末端端をリン酸化する。5'末端をリン酸化した、上の鎖と下の鎖に相当する2本の合成オリゴヌクレオチドを混合し、その水溶液温度を70℃から室温まで徐々に冷却することにより、アニリングを行なった。以上のようにして、C₂部位とC₃部位との連結部分に相当するTaqI \rightarrow SmaIのDNA断片(約

68bp) を取得した。

一方、前記実施例7で作成したプラスミド pF C70 DNA 約5μg を、実施例4記載の制限酵素 Sma I 切断用バッファーに溶解し、2~5ユニットの Sma I を加えて20℃で15~45分反応させて部分分解を行なう。フェノール抽出により Sma I を失活させた後、実施例4の方法に準じて、制限酵素 Bam HI による切断を行なう。アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) の後、C_H 3 部位遺伝子とベクターの大部分を含む第6図記載の Bam HI → Sma I - (I) の DNA 断片 (約3.6 Kbp) を、実施例5の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、C_H 2 部位遺伝子を含む Sau 3 A I → Taq I の DNA 断片、C_H 2 部位と C_H 3 部位の連結部分に相当する Taq I → Sma I の DNA 断片、そして C_H 3 部位とベクター部分を含む Bam HI (Sau 3 A I) → Sma I - (I) の DNA 断片を混合し、実施例5の方法に準じて、C_H 2 部位遺伝子と C

片を、実施例7の方法に準じて、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

さらに、プロモーターと Fc 領域遺伝子との連結部分に相当する、第7図記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチド (約39bp) を、実施例8の方法に準じて作成した。この Cla I → Bst NI - (I) の DNA 断片中には、trp プロモーターとの連結のための制限酵素 Cla I サイト、ATG という塩基配列で表わされる翻訳開始コドン、h 部位遺伝子及び C_H 2 部位遺伝子の一部が連続して含まれており、この DNA 断片を用いることにより、イントロンのない Fc 領域 (h - C_H 2 - C_H 3 部位) 遺伝子をトリプトファン・オペロン・SD 配列下流に適当な距離をへだてて連結することが可能になった。

一方、trp プロモーターを含むプラスミド pY S31N (約4.7 Kbp) を、実施例4の方法に準じて制限酵素 Pst I 及び Cla I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) の後、trp プロモーター及びベクターの一部を含む

h 3 部位遺伝子がイントロンを介せずに連結された遺伝子を含むプラスミド pF C77 (約3.9 Kbp) を作成した。第6図に pF C77 の作成方法を示した。

実施例9 (Fc 領域遺伝子と trp プロモーターとの連結)

実施例8で得られたプラスミド pF C77 を、実施例4の方法に準じて制限酵素 Sst II 及び Pst I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) の後、C_H 2 部位遺伝子の後半部分、C_H 3 部位遺伝子全域及びベクターの一部を含む、第7図記載の Sst II → Pst I の DNA 断片 (約2.7 Kbp) を、実施例5の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

次に、実施例7で得られた Fc 領域遺伝子を含む約1.7 Kbp の DNA 断片を、実施例4の方法に準じて制限酵素 Bst NI 及び Sst II で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5%) の後、C_H 2 部位遺伝子の前半部分を含む約171bp の Bst NI - (I) → Sst II の DNA 断

第7図記載の Pst I → Cla I の DNA 断片 (約1.1 Kbp) を、実施例5の方法によりアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、C_H 2 部位後半と C_H 3 部位遺伝子とベクターの一部を含む Sst II → Pst I の DNA 断片、C_H 2 部位遺伝子前半部分を含む Bst NI - (I) → Sst II の DNA 断片、プロモーターと Fc 領域遺伝子との連結部分に相当する Cla I → Bst NI - (I) の DNA 断片、そして trp プロモーターとベクターの一部を含む Pst I → Cla I の DNA 断片を混合し、実施例5の方法に準じて、Fc 領域 (h - C_H 2 - C_H 3 部位) 遺伝子発現型プラスミド pF C203 (約4.0 Kbp) を作成した。第7図に pF C203 の作成方法を示した。

実施例10 (Fc 領域遺伝子翻訳終止コドンのタンデム化)

実施例9で得られた Fc 領域遺伝子発現型プラスミド pF C203 を、実施例8に記載の方法に準じて、制限酵素 Sma I で部分分解した後、制限

酵素 Pst I による完全分解を行なう。アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、Fc 領域遺伝子の大部分とベクターの一部を含む第 8 図記載の Sma I-② → Pst I の DNA 断片 (約 1.8 Kbp) を、実施例 5 の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

また、C₃ 3 部位遺伝子後部と翻訳終止コドンに相当する、第 8 図記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴヌクレオチド (約 17bp) を、実施例 8 の方法に準じて作成した。この Sma I-② → Bam HI の DNA 断片中には、C₃ 3 部位遺伝子の一部、T A A T A G という塩基配列で表わされるタンデム化翻訳終止コドン及びベクターとの連結のための制限酵素 Bam HI サイトが含まれており、この DNA 断片を用いることにより Fc 領域遺伝子の翻訳終止コドンのタンデム化が可能になった。

一方、プラスミド pBR322 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Pst I 及び Bam HI で切断、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %)

の後、ベクターの大部分を含む、第 8 図記載の Bam HI → Pst I の DNA 断片 (約 3.2 Kbp) を、実施例 5 の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、Fc 領域遺伝子の大部分とベクターの一部を含む Sma I-② → Pst I の DNA 断片、C₃ 3 部位遺伝子後部とタンデム化翻訳終止コドンを含む Sma I-② → Bam HI の DNA 断片、そしてベクターの大部分を含む Bam HI → Pst I の DNA 断片を混合し、実施例 5 の方法に準じて、タンデム化翻訳終止コドンを含む Fc 領域遺伝子発現型プラスミド pFC211 (約 5.0 Kbp) を作成した。第 8 図に pFC211 の作成方法を示した。

実施例 11 (Fc 領域遺伝子と tac プロモーターとの連結)

実施例 9 で得られた Fc 領域遺伝子発現型プラスミド pFC203 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Cla I で切断し、ポリメラーゼ用バッファー (50mM Tris-HCl (pH 7.2)、10

mM MgSO₄、0.1mM ジチオスレイトール、50 µg/ml ウシ血清アルブミン) 40 µl に溶解し、0.25mM の dGTP 及び 0.25mM の dCTP 存在下で、2 ユニットの DNA ポリメラーゼ I・ラージ・フラグメント (ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ) を加える。37℃ で 30 分間反応させて、末端の平滑化をはかる。次にこの DNA 断片を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Pst I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、Fc 領域遺伝子全長とベクターの大部分を含む、第 9 図記載の約 2.8 Kbp の DNA 断片を、アガロースゲルより回収した。

次に、tac プロモーターを含むプラスミド pDR540 (約 4.0 Kbp、フェルマシア) DNA を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Bam HI で切断し、ついで上記の方法に準じて、dGTP、dATP、dTTP、dCTP 存在下、DNA ポリメラーゼ I・ラージ・フラグメント処理により、末端の平滑化を行なう。次にこの DNA 断片を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Pst I で切断

し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、tac プロモーターとベクターの一部を含む、第 9 図記載の約 1.1 Kbp の DNA 断片を、アガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、Fc 領域遺伝子全長とベクターの大部分を含む約 2.8 Kbp の DNA 断片と、tac プロモーターとベクターの一部を含む約 1.1 Kbp の DNA とを混合し、実施例 5 の方法に準じて、tac プロモーターの下流に Fc 領域遺伝子が連結した形の発現型プラスミド pFC361 (約 3.9 Kbp) を作成した。第 9 図に pFC361 の作成方法を示した。

上記により得られた Fc 領域遺伝子発現型プラスミド pFC361 DNA を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Sst II 及び Pst I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、ベクターの一部、tac プロモーター及び Fc 領域遺伝子前半部分を含む、第 9 図記載の Sst II → Pst I の DNA 断片 (約 1.3 Kbp) を、実施例 5 の方法によりアガロースゲルより回収した。

また、実施例10により得られたタンデム化翻訳終止コドン有するF c領域遺伝子発現型プラスミドpFC211 DNAを、実施例4の方法に準じて制限酵素SstⅡ及びPstⅠで切断した後、上記と同じ手法により、F c領域遺伝子後半部分、タンデム化翻訳終止コドン及びベクターの大部分を含む、第9図記載のPstⅠ→SstⅡのDNA断片(約3.6 Kbp)を得た。

かくして得られた、ベクターの一部、tacプロモーター及びF c領域遺伝子前半部分を含むSstⅡ→PstⅠのDNA断片と、F c領域遺伝子後半部分、タンデム化翻訳終止コドン及びベクターの大部分を含むPstⅠ→SstⅡのDNA断片とを混合し、実施例5の方法に準じて、tacプロモーターの下流にF c領域遺伝子が連結され、なおかつタンデム化翻訳終止コドン有する形の発現型プラスミドpFC362(約4.9 Kbp)を作成した。第9図にpFC362の作成方法を示した。

実施例12(好アルカリ性バチルス№170株染色体

DNAの調製)

ベニシリナーゼを菌体外に生成、蓄積する能力を有する好アルカリ性のバチルス№170株(FERM BP-467)を培地(g/l): グリセロール 2.0、酵母エキス 5.0、ポリペプトン 5.0、K₂HPO₄ 1.0、MgSO₄ · 7H₂O 0.2をNaHCO₃ 10でpH 9.0に調整したもの)中、30℃で15時間振盪培養を行ない、対数増殖後期の菌体を集菌後、フェノール法によるDNA抽出法によって染色体DNAを抽出、精製し、染色体DNA 5mgを得た。

実施例13(好アルカリ性バチルス№170株染色体DNA断片のベクターへの挿入)

実施例12で得られた染色体DNA 10μgをとり、実施例4の方法に準じて、制限酵素EcoRIを加え、37℃で反応させて部分的に切断した。一方、ベクターとして用いるテトラサイクリン抵抗性(Tet^r)のpMB9プラスミドDNA(ベセスグ・リサーチ・ラボラトリーズ)を制限酵素EcoRIで完全に切断して65℃、5分の熱処理後、

前者と混合し、実施例2の方法に従ってT4-DNAリガーゼによって10℃、24時間DNA鎖の連結反応を行ない、65℃、5分の熱処理後、反応液に2倍容のエタノールを加えて染色体DNAを組み込んだプラスミドDNAを沈殿、採取した。

実施例14(好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ遺伝子のクローン化)

実施例13で得られた好アルカリ性バチルス№170株染色体DNAを有するプラスミドを、通常のCaCl₂法(H.V. Norgardらの方法、前記)により、エシェリヒア・コリHB101株に導入した。これらの形質転換株の中からアンピシリン及びテトラサイクリンに耐性の株をスクリーニングし、好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ遺伝子を有するクローンを選択した。この菌体を培養した後第10図のように処理することにより、ベニシリナーゼ遺伝子を含む4.5 Kbpの挿入を有する置換えプラスミドpEAP1が得られた。さらに、実施例4の方法に準じて制限酵素切断点地図を作成した。第11図にpEAP1の制限酵素切

断点地図を示す。

実施例15(好アルカリ性バチルス№170株染色体DNAを有するプラスミドのDNA塩基配列の決定)

好アルカリ性バチルス№170株の染色体DNAを含むプラスミドのDNA塩基配列の決定は、M13シークエンシング・キット(アマージム)を用い、M13ファージによるジデオキシ・チェーン・ターミネーション法により行なった。第1図に好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ遺伝子プラスミド領域・シグナル領域のDNA塩基配列を、第2図にプラスミドpMB9由来のKi1遺伝子のDNA塩基配列を、そして第3図に好アルカリ性バチルス№170株染色体DNA由来のExプロモーターのDNA塩基配列を、それぞれ示した。

実施例16(好アルカリ性バチルス№170株染色体DNAを有する各種プラスミド誘導体の作成)

前記実施例14で得られたエシェリヒア・コリH

B101(pEAP1)株を継代していく中で、ベニシリナーゼ活性の増強(pEAP1の約3倍)された変異株(アンピシリン耐性(Ap^r)、テトラサイクリン感受性(Tet^s))を得た。この変異株から第10図の方法によりプラスミドを調製したところ、ベニシリナーゼの構造遺伝子の上流約4 Kbpが脱落したプラスミドpEAP3(約5.8 Kbp)が得られた。第12図にpEAP3の制限酵素切断点地図を示す。

こうして得られたpEAP3プラスミド1μgを実施例4の方法に準じて制限酵素EcoRIとHindIIIを加えて、37℃、2時間反応させて切断した。次に実施例11の方法に準じてDNAポリメラーゼ[ラージ・フラグメントを加えて、室温で30分間反応させ、DNA切断面を平滑末端とし、ついで、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼによって、室温、24時間DNA鎖の連結反応を行い、65℃、5分間の熱処理後、反応液に2倍容のエタノールを加えてプラスミドDNAを沈澱、採取した。得られたプラスミドDNAを実施

例11の方法に準じてDNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメントにより末端を平滑化する。実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結反応を行ない、上記と同様にしてエシェリヒア・コリH B101株に導入形質転換し、クロラムフェニコール及びアンピシリン耐性形質転換株からプラスミドを分離精製し、プラスミドpEAP6にCAT遺伝子が第12図において反時計まわりの向きに挿入された形のプラスミドpEAP7(約6.1 Kbp)を作成した。第12図にpEAP7の作成方法を示した。

こうして得られたプラスミドpEAP7を実施例4の方法に準じて制限酵素HindIIIで切断し、実施例11の方法に準じてDNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメントにより末端を平滑化した。実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて自己連結反応を行ない、上記と同様にして、プラスミドpEAP7のHindIIIサイトを欠失させた形のプラスミドpEAP7ΔH(約6.1 Kbp)を作成した。第13図にpEAP7ΔHの作成方法を示す。

さらにプラスミドpEAP7ΔHを、実施例4の方法に準じて制限酵素CmaIで切断し、実施

例14と同様にエシェリヒア・コリH B101株に導入形質転換し、アンピシリン耐性形質転換株から第10図の方法によりプラスミドを分離精製し、約1.0 KbpのEcoRI→HindIII DNA断片の脱落したプラスミドpEAP6(約4.8 Kbp)を得た。第12図にpEAP6の作成方法を示した。

次に、プラスミドpBR329(約4.15 Kbp) [L. Covarrubias ら, Gene, 17, 79(1982)] DNA10 μgを、実施例4の方法に準じて制限酵素AccIIで切断した後、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度1.5%)を行ない、エレクトロエリユーション法 [P.J. Greene ら, "Methods in Molecular Biology" vol. 7, Marcel Dekker, 1974, P. 87] を用いて、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を含むAccII→AccIIのDNA断片(1.3 Kbp)を回収した。また先に得られたプラスミドpEAP6を実施例4の方法に準じて制限酵素SmaIで切断した後、上記のAaccII→AaccIIのDNA断片と混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガー

例11の方法に準じてDNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメントにより末端を平滑化する。実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結反応を行ない、上記と同様にしてエシェリヒア・コリH B101株に導入形質転換し、クロラムフェニコール耐性・アンピシリン感受性の形質転換株からプラスミドを分離精製し、プラスミドpEAP7ΔH中に2ヶ所存在するCmaIサイトを両方共欠失させた形のプラスミドpEAP7ΔCCH(約6.1 Kbp)を作成した。第13図にpEAP7ΔCCHの作成方法を示す。

得られたプラスミドpEAP7ΔCCHを、実施例4の方法に準じて制限酵素HincIIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、ベニシリナーゼ遺伝子(一部欠失)を含まない約3.8 KbpのHincII→HincIIのDNA断片をエレクトロエリユーション法より回収する。一方、上述のプラスミドpEAP7も同様にして制限酵素HincIIで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)を行ない、ベニシリ

ナーゼ遺伝子を含む約2.3 KbpのHincII→HincIIのDNA断片を回収する。これら2種のDNA断片を、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結し、上記と同様にエシエリヒア・コリHB101株に導入形質転換し、クロラムフェニコール及びアンピシリンに耐性の形質転換株の中からプラスミドを分離精製し、プラスミドpEAP7ACH(約6.1 Kbp)を作成した。第13図にpEAP7ACHの作成方法を示す。

こうして得られたプラスミドpEAP7ACHを、実施例4の方法に準じて制限酵素HpaIで切断した後、末端をリン酸化したSaeIリンカー(宝酒造)と混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結反応を行なう。エタノール沈澱の後、実施例4の方法に準じて制限酵素CmaI及びSaeIで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)を行ない、ベニシリナーゼ遺伝子後半部、Exプロモーター領域及びベクターの大部分を含む4.5 KbpのCmaI

→SaeIのDNA断片をエレクトロエリクション法により回収する。一方、後述の実施例16で得られたプラスミドp329PSを同様にして制限酵素CmaI及びSaeIで切断、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)を行ない、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む約200bpのSaeI→CmaIのDNA断片をエレクトロエリクション法により回収する。こうして得られた2種のDNA断片を混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼで連結後、上記と同様にエシエリヒア・コリHB101株に導入形質転換し、クロラムフェニコール耐性の形質転換株の中からプラスミドを分離精製し、分泌プラスミドベクターpEAP8(4.7 Kbp)を作成した。第14図にpEAP8の作成方法を示す。

先に作成したプラスミドpEAP5を実施例4の方法に準じて制限酵素HinfIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、好アルカリ性バチルス株170株染色体DNA由来

Exプロモーター領域とプラスミドpMB9由来Kil遺伝子から成る菌体外分泌生産に与する領域を含む約0.95 KbpのHinfI→HinfIのDNA断片を、エレクトロエリクション法により回収する。このDNA断片について、実施例11の方法に準じてDNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメントを用いた末端の平滑化を行ない、実施例2の方法に準じて末端をリン酸化したEcoRIリンカー(宝酒造)とT4-DNAリガーゼによって連結する。エタノール沈澱の後、実施例4の方法に準じて制限酵素EcoRIで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)・エレクトロエリクション法によって末端にEcoRIサイトを有するEcoRI→EcoRIのDNA断片(約0.95 Kbp)を回収する。次に、プラスミドpBR329を、実施例4の方法に準じて制限酵素EcoRIで切断し、上記約0.95 KbpのEcoRI→EcoRIのDNA断片と混合、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼによる連結反応を行なった。上記と同様にエシエリ

ヒア・コリHB101株に導入形質転換し、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性の形質転換株よりプラスミドを分離精製し、多コピー型分泌プラスミドベクターp329EXK(約5.1 Kbp)を作成した。第15図にp329EXKの作成方法を示す。実施例17(好アルカリ性菌ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域を有するプラスミド)の作成)

CAT遺伝子誘導体を含むプラスミドpCM1(約4.1 Kbpファルマシア)を実施例4の方法に準じて制限酵素EcoRI及びSaeIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、実施例15の方法に準じて約0.5bpのCAT遺伝子の後半部分を含むEcoRI→SaeIのDNA断片を回収する。さらに、CAT遺伝子誘導体を含むプラスミドpCM7(約4.1 Kbp、ファルマシア)を上記と同様に、制限酵素EcoRI及びSaeIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、CAT遺伝子前半部分とベクターの大部分から成る約3.1 KbpのEco

○ R I → S a e I の DNA 断片を回収する。これらの DNA 断片を混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼで連結し、実施例 16 の方法に準じて C A T 遺伝子誘導体を含む新規プラスミド p C M 7 I (約 3.6 Kbp) を作成した。第 16 図に p C M 7 I の作成方法を示す。

前記実施例 16 で得られたプラスミド p E A P 3 を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 R s a I で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5 %) 後、実施例 16 の方法に準じてベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナル領域を含む R s a I → R s a I の DNA 断片 (約 200bp) を回収する。この R s a I → R s a I の DNA 断片を末端をリン酸化した H i n d III リンカー (宝酒造) と混合、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結した後、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で切断する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5 %) の後、実施例 15 の方法に準じて末端が H i n d III サイトに変換されたベニシリナーゼ遺伝子プ

ロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む DNA 断片 (約 210bp) を回収する。一方、プラスミド p C M 7 I を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で切断し、上記のベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む H i n d III → H i n d III の DNA 断片と混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結させ、実施例 16 の方法に準じてアンピシリン耐性、クロラムフェニコールを耐性の形質転換株よりプラスミド p P S I (約 3.7 Kbp) を分離・精製した。このプラスミド p P S I においては、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域が、C A T 遺伝子の upstream に同じ読み取り方向で挿入された構造を有している。第 17 図に p P S I の作成方法を示した。

こうして得られたプラスミド p P S I を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で部分分解し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、上記と同様にして 2ヶ所存在する H i n d III サイトのうち 1ヶ所のみが切断された H i n d III 領域を含む約 210bp の S a e I → H i n d III の DNA 断片をエレクトロリユース法により回収する。一方、プラスミド p B R 329 も同様に制限酵素 H i n d III 及び S a e I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) を行ない、ベクターの大部分を含む約 3.6 Kbp の H i n d III → S a e I の DNA 断片を回収する。こうして得られた 2 種類の DNA 断片を混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼで連結した後、上記方法に準じて、プラスミド p 329 P S を作成した。第 18 図に p 329 P S の作成方法を示す。

実施例 18 (F c 領域遺伝子ベリプラズム分泌発現型プラスミドの作成)

実施例 11 で作成した F c 領域遺伝子菌体内発現型プラスミド p F C 362 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 S - s t II 及び E c o R I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、t a c プロモーター領域・h 部位遺伝子・C_H2 部位遺伝子の前半部分を含む約 0.4 Kbp の E c o

III → H i n d III の DNA 断片 (約 3.7 Kbp) を回収する。この H i n d III → H i n d III の DNA 断片を実施例 11 の方法に準じて DNA ポリメラーゼ I・ラージ・フラグメントを用いて末端を平滑化した後、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼによって自己閉環させる。このようにして上記方法に準じて、プラスミド p P S I 中のベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域 upstream に存在する H i n d III サイトを欠失させた形のプラスミド p P S I Δ H (約 3.7 Kbp) を作成した。第 18 図に p P S I Δ H の作成方法を示す。

さらにプラスミド p P S I Δ H を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 C e a I で切断した後、末端をリン酸化した S a e I リンカー (宝酒造) と混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結反応を行なう。エタノール沈澱の後、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III 及び S a e I で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5 %) を行ない、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペ

チド領域を含む約 210bp の S a e I → H i n d III の DNA 断片をエレクトロリユース法により回収する。一方、プラスミド p B R 329 も同様に制限酵素 H i n d III 及び S a e I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) を行ない、ベクターの大部分を含む約 3.6 Kbp の H i n d III → S a e I の DNA 断片を回収する。こうして得られた 2 種類の DNA 断片を混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼで連結した後、上記方法に準じて、プラスミド p 329 P S を作成した。第 18 図に p 329 P S の作成方法を示す。

実施例 18 (F c 領域遺伝子ベリプラズム分泌発現型プラスミドの作成)

実施例 11 で作成した F c 領域遺伝子菌体内発現型プラスミド p F C 362 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 S - s t II 及び E c o R I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、t a c プロモーター領域・h 部位遺伝子・C_H2 部位遺伝子の前半部分を含む約 0.4 Kbp の E c o

R I → S a I の DNA 断片と、ベクターの大部分・C₂ 2 部位遺伝子後半部分・C₃ 3 部位遺伝子を含む約4.5 Kbpの E c o R I → S a t I の DNA 断片とを、実施例 5 の方法に準じてゲルより回収する。このうちの t a c p r o m o t e r 領域・h 部位遺伝子・C₂ 2 部位遺伝子前半部分を有する E c o R I → S a t I の DNA 断片を、実施例 4 の方法により制限酵素 B s t N I で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度 5 %）の後、C₂ 2 部位遺伝子の一部を含む約171bp の B s t N I → S a t I の DNA 断片を、実施例 7 の方法に準じてゲルより回収する。さらに、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域と F c 領域遺伝子との連結部分に相当する。第19図記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴヌクレオチド（約51bp）を、実施例 8 の方法に準じて作成した。この E c o R I → B s t N I の DNA 断片中には、後のサブクローニングに必要な制限酵素 S a l I サイト、ベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域遺伝子との連

結のための制限酵素 H i n d III サイト、アミノ酸セリンをコードする T C A のコドン、h 部位遺伝子及び C₂ 2 部位遺伝子の一部が含まれている。この DNA 断片を用いることにより、大腸菌内で正しくシグナルペプチドが切断され、F c 領域蛋白質のアミノ末端にアミノ酸セリンが1個余分についた形の蛋白質の産生が期待できる。以上のようにして得られた、ベクターの大部分・C₂ 2 部位遺伝子後半部分・C₃ 3 部位遺伝子を含む E c o R I → S a t I の DNA 断片、C₂ 2 部位の遺伝子の一部を含む B s t N I → S a t I の DNA 断片、及びベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域と F c 領域遺伝子との連結部分に相当する E c o R I → B s t N I の DNA 断片とを混合し、実施例 5 の方法に準じて、プラスミド p S E C - F C（約4.7 Kbp）を作成した。第19図に p S E C - F C を示す。

こうして得られたプラスミド p S E C - F C を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で切断する。一方、実施例 17 で得られたベニシリナー

ゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域を含むプラスミド p P S 1 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度 5 %）の後、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域を含む H i n d III → H i n d III の DNA 断片（約210bp）をエレクトロリユージョン法により回収する。この DNA 断片を先に調製したプラスミド p S E C - F C の制限酵素 H i n d III 切断物と混合し、実施例 17 の方法に準じて、F c 領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミド p P S - F C を作成した。第20図に p P S - F C の作成方法を示した。

実施例 19（F c 領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドの作成）

実施例 18 で作成したプラスミド p S E C - F C を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 B a m H I で切断し、実施例 8 の方法に準じて作成した制限酵素 C e a I サイトを含む第19図記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴヌクレオチド（約14bp）と

混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - D N A リガーゼを用いて連結反応を行なう。実施例 16 の方法に準じて、プラスミド p S E C - F C 中に存在する制限酵素 B a m H I サイトを制限酵素 C e a I サイトに変換した形のプラスミド p S E C - F C C（約4.7 Kbp）を作成した。第19図にプラスミド p S E C - F C C の作成方法を示す。このようにして得られたプラスミド p S E C - F C C を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III 及び C e a I で切断、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度 0.8 %）の後、F c 領域遺伝子を含む約0.7 Kbp の H i n d III → C e a I の DNA 断片を上記と同様に回収する。一方、実施例 16 で作成した分泌プラスミドベクター p E A P 8 を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III 及び C e a I で切断、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度 0.8 %）の後、プラスミド p E A P 8 の大部分を有する C e a I → H i n d III の DNA 断片（約4.7 Kbp）を上記と同様に回収する。これら 2 種の DNA 断片を混合、実施例 2 の方法に準じて T 4 -

DNAリガーゼで連結させ、実施例16の方法に準じてF c領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC10(約5.6 Kbp)を作成した。第21図にpEXFC10の作成方法を示す。

一方、実施例18で得られたF c領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-F cを実施例4の方法に準じて制限酵素BamHI及びSaeIで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、ペニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域及びF c領域遺伝子を含む約0.9 KbpのSaeI→BamHIのDNA断片をエレクトロエリクション法により回収する。また、実施例16で得られた多コピー型分泌プラスミドベクターp329EXKを実施例4の方法に準じて制限酵素BamHI及びSaeIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、上記と同様にしてプラスミドp329EXKの大部分を含む約4.8 KbpのBamHI→SaeIのDNA断片を回収する。これら2種のDNA断片を実施例2の方法に準じてT4-

DNAリガーゼで連結し、実施例16の方法に準じてF c領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC100(約5.7 Kbp)を作成した。第22図にpEXFC100の作成方法を示す。

実施例20(F c領域蛋白質の分泌発現確認)

前記実施例11で得られたF c領域遺伝子菌体内発現型プラスミドpF c362を有するエシェリヒア・コリ600株、実施例18で得られたF c領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-F cを有するエシェリヒア・コリHB101株、及び実施例19で得られたF c領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC10又はpEXFC100を有するエシェリヒア・コリHB101株を、最終濃度30 µg/mlのアムピシリンを含むLBG培地(1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl、0.1% グルコース、0.2% グリセロール(pH7.2))に接種し、37℃で24時間振とう培養を行なう。ただし、プラスミドpEXFC10を有するエシェリヒア・コリHB101株の場合には、アムピシリンのかわりに最終濃度20

µg/mlのクロラムフェニコールを用いた。培養終了後、オスモティック・ショック法(C.Katoら、前出)により、培養物を、菌体外面分、ペリプラズム面分、菌体内面分に分離する。すなわち、遠心分離によって菌体を分離した培養上清を菌体外面分とする。次に菌体を生理食塩水で洗浄した後、1 mM EDTAを含む25%ショ糖溶液に懸濁させて、37℃で10分振とうする。遠心分離によって菌体を集めた後、菌体を氷冷した水に懸濁させ、4℃で10分振とうする。この懸濁液に等量の0.1 Mリン酸バッファー(pH7.0)を加えた後、遠心分離を行ない、菌体と分離した上清部分をペリプラズム面分とする。さらに、この菌体を0.05 Mリン酸バッファー(pH7.0)に懸濁させ、超音波により菌体を破壊する。遠心分離によって菌体残渣を除去した上清部分を菌体内面分とした。

得られた両面分のサンプルは、アセトン乾燥を行なった後、Tris-HClバッファー(pH6.8)、SDS、2-メルカプトエタノール、グリセロールを、それぞれ最終濃度60 mM、2%、4%、

10%になるように加えて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(鈴木、道伝、21、43(1977))を行なった。分離用ゲルは12.5%とし、泳動バッファーはSDS-Tris-グリシン系(U.K.Laemmli, Nature, 227、680(1970))を用いた。電気泳動終了後、ゲル中の蛋白質を、25 mM Tris-192 mM グリシン(pH8.3)-20%メタノールのバッファー中で、電気泳動的にニトロセルロース・フィルターに吸着させ、ウエスタン・ブロッティングを行なった。蛋白質を吸着させたニトロセルロース・フィルターを3%ゼラチンを含むTBSバッファー(20 mM Tris-HCl(pH7.5)、500 mM NaCl)中に60分浸した後、一次抗体としてウサギ抗ヒトIgG-Fc成分抗血清(カツベル)を用いた間接法で、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いたイミューン・プロット・アッセイ・キット(バイオ・ラッド)により、ヒトIgG-Fc領域蛋白質を特異的に染色した。結果の一部を複写して第23図に示した。この際に、後記参考例記載の方法により

調製した既知量の天然型ヒト免疫IgG Fc領域蛋白質も同一のSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動等を行なった。

第23図より、Fc領域遺伝子菌体内発現型プラスミドpFC362を有するエシェリヒア・コリC600株の場合には、Fc領域蛋白質は菌体内画分のみ局在しているのに対して、ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-Fcを有するエシェリヒア・コリHB101株の場合にはペリプラズムまで、菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC10またはpEXFC100を有するエシェリヒア・コリHB101株の場合には菌体外画分にまで、それぞれFc領域蛋白質が分泌されていることがわかる。また、天然型Fc領域蛋白質にくらべて大腸菌産生Fc領域蛋白質の分子量が約5000ダルトン程度小さいという第23図の結果から考えて、大腸菌産生Fc領域蛋白質には糖鎖の付加がおこってらず、シグナルペプチドは除去されているものと思われる。

参考例 (天然型ヒト免疫グロブリン Fc領域

蛋白質の調製)

0.3gのヒトIgG (シグマ)、17.5mgのステイン、7.5mgのEDTA・2NaをPBSバッファー (100mM リン酸バッファー (pH7.4)、140mM NaCl) に溶解し、150μgのパバイン (シグマ、タイプIV) を添加して、37℃で7時間放置する。パバイン処理後のIgGを、PBSバッファーで平衡化したセファデックスG-200スーパー・ファイン・ゲル (ファルマシア) を用いたゲル濾過カラムにかけ、パバイン処理によって生成したFc領域蛋白質及びFab領域蛋白質を、未反応のIgGと分離した。得られたFc領域蛋白質とFab領域蛋白質を含む溶液を水に対して透析し、凍結乾燥によって濃縮した後、DE52・DEAEセルロース (ワットマン) を用いたイオン交換カラムにかけた。カラムを10mM リン酸バッファー (pH7.4) で洗浄し、Fab領域蛋白質を完全に溶出させた後、NaCl濃度を0mMから350mMまで直線的に変化させた10mM リン酸バッファー (pH7.4) を用いて、Fc領域

蛋白質を溶出させた。上記と同様にして透析、凍結乾燥を行ない、天然型ヒトIgG Fc領域蛋白質を取得した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトIgG Fc領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-FcのDNA塩基配列の一部と、それに対応する好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ・シグナルペプチドとFc領域蛋白質のアミノ酸配列を示したものである。

第2図は、プラスミドpMB9中に存在するK11遺伝子のDNA塩基配列を示したものである。

第3図は、好アルカリ性バチルス№170株染色体DNA中に存在するExプロモーター領域のDNA塩基配列を示したものである。

第4図は、ヒトIgG遺伝子を含むファージ・クロンの制限酵素切断点地図とFc領域遺伝子を含むサブクロンの制限酵素切断点地図とを示したものである。

第5図は、C_H3部位遺伝子を含むプラスミド

pFC70の作成方法を示したものであり、第6図はC_H2-C_H3部位遺伝子を含むプラスミドpFC77の作成方法を示したものである。

第7図、第8図、第9図はそれぞれFc領域遺伝子菌体内発現型プラスミドpFC203、pFC211、pFC329の作成方法を示したものである。

第10図は、プラスミドDNAの大腸菌からの分離・精製方法を示したものである。

第11図は、好アルカリ性バチルス№170株ベニシリナーゼ遺伝子のクロン化の方法を示したものである。

第12図、第13図、第14図、第15図は、菌体外分泌生産に関与する情報を担うDNA領域を含むプラスミドpEAP3、pEAP6、pEAP7、pEAP7ΔH、pEAP7ΔCCH、pEAP7ΔCH、pEAP8、p329EXKの作成方法を示したものである。

第16図は、クロラムフェニコールセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子を含むプラスミドpCM71の作成方法を示したものである。

第17図、第18図は、ペニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域を含むプラスミドpPSI、pPSIΔH、p329PSの作成方法を示したものである。

第19図は、シグナルペプチド領域遺伝子との連結用ジョイントを有するFc領域遺伝子を含むプラスミドpSEC-FC、pSEC-FCCの作成方法を示したものである。

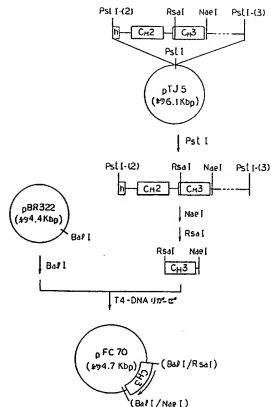
第20図は、Fc領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-FCの作成方法を示したものである。

第21図、第22図は、Fc領域遺伝子固外分泌発現型プラスミドpEXFC10、pEXFC100の作成方法を示したものである。

第23図は、Fc領域蛋白質の分泌確認結果を示したものである。

代理人 弁理士 有我 軍 一 郎
(外1名)

第 5 図



第 1 図 の (1)

TTTAAAGCGTAGAAAAATTTTGTACGCTTTTTTGTAAATTACATAAAAGTATGCAAA
TGAAGATGGAACAACATTTTGAGATGAATTGTCTAATATAGGTAATACTATTTAGC
TTGAAAGAAAAGGTTGATAACATG-AAA-AAG-AAT-ACG-TTG-TTA-AAA-GTA-
Met-Lys-Lys-Asn-Thr-Leu-Leu-Lys-Val-
GGA-TTA-TGT-GTA-AGT-TTA-CTA-GCA-ACA-ACT-CAA-TTT-GTT-AGC-
Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
ACG-ATT-TCT-TCT-GTA-CAW-GCT-TCA-ACA-TGC-CCA-CCG-TGC-CCA-
Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
GCA-CCT-GAA-CTC-CTG-GGG-GGA-CCG-TCA-GTC-TTC-CTC-TTC-CCC-
Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-
CCA-AAA-CCC-AAG-GAC-ACC-CTC-ATG-ATC-TCC-CGG-ACC-CCT-GAG-
Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-MET-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-
GTC-ACA-TGC-GTG-GTG-GTG-GAC-GTG-AGC-CAC-GAA-GAC-CCT-GAG-
Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-
GTC-AAG-TTC-AAC-TGC-TAC-GTG-GAC-GGC-GTG-GAG-GTG-CAT-AAT-
Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
GCC-AAG-ACA-AAG-CCG-CGG-CAG-GAG-GAG-TAC-AAC-AGC-ACG-TAC-
Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-

第 1 図 の (2)

CGG-GTG-GTC-AGC-GTC-CTC-ACC-GTC-CTG-CAG-GAC-TGG-CTG-
 Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Tyr-Leu-
 AAT-GGC-AAG-GAG-TAC-AAG-TGC-AAG-CTC-TCC-AAC-AAA-CCC-CTC-
 Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-
 CCA-GCC-CCC-ATC-GAG-AAA-ACC-ATC-TCC-AAA-GCC-AAA-GGG-CAG-
 Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-
 CCG-GAA-CCA-CAG-GTG-TAC-ACC-CTG-CCC-CCA-TCC-CGG-GAG-
 Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Ser-Arg-Glu-
 CAG-ATC-ACC-AAG-AAC-CAG-GTC-AGC-CTG-ACC-TGC-CTG-GTC-AAA-
 Glu-MET-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-
 GGC-TTC-TAT-CCC-AGC-GAC-ATC-GCC-GTG-GAG-TGG-GAG-AGC-AAT-
 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-
 GGG-CAG-CCG-GAG-AAC-AAC-TAC-AAG-ACC-ACG-CCT-CCC-GTG-CTG-
 Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Thr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-
 GAC-TCC-GAC-GGC-TCC-TTC-TTC-CTC-TAT-AGC-AAAG-CTC-ACC-GTG-
 Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-
 GAC-AAG-AGC-AGG-TGG-CAG-CAG-GGG-AAC-GTC-TTC-TCA-TGC-TCC-
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-
 TGC-ATG-CAT-GAG-GCT-CTG-CAC-AAC-CAC-TAC-ACG-CAG-AAG-AGC-
 Val-MET-His-Glu-Ala-Leu-Ile-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-
 CTC-TCC-CTTCC-CCG-GGT-AAA-TAATAAGCATCC
 Leu-Ser-Ile-Ser-Pro-Gly-Lys

第 2 図

Kil 遺伝子

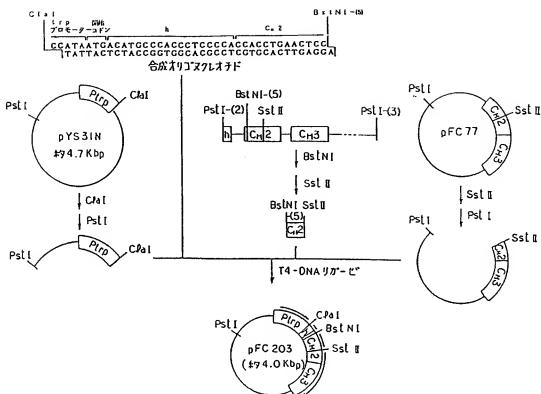
ATGAGGAAAAGATTTTTGTGGGAATATTCGGGATAAACTCTCTGTTGATGTCAGGGCTAACTATACCTCATCTTCAAGGAGGAGG 90
 MetArgLysArgPhePheValGlyIlePheAlaIleAsnLeuLeuValGlyCysGlnAlaAsnTyrIleAsnAspValGlnGlyGlyThr
 ATCGCACCATCCTCTCTCTAAAGTACCGGATCCGGCTTCAAGTAG 120
 IleAlaProSerSerSerSerLysLysLysThrGlyTyrAlaValGlnAsn

第 3 図

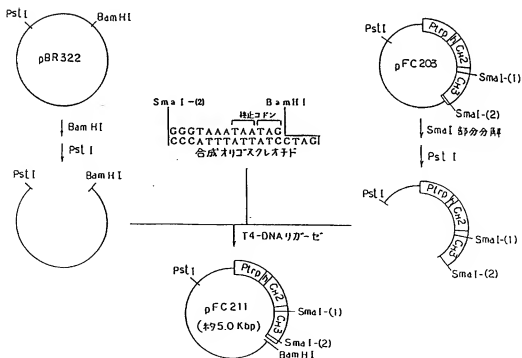
Exプロモーター

Hinc II 30
 GTCAACAATA TGAACGTGCA CAAATCTTAT ATATATATTG TCAATGCAAT CACATCACTT 60
 TTTTTCAAATG GGTATATAC TTAAGGTGTA ATGAATGATT GGGAGAGGGT CGGATGATA 120
 GTTTTGTAT CAATGTGAAC AAAGCCAACA GCGCGTTGTA AAGTAATGGG TGTTTGTGCG 180
 CAGAAATCAA ACGATTGCGA GTTTACAAGA TACGATTGTG TTTGGGCTAA AAGGAATTGC 240
 AGCTTATGCC AGACATGCTC CTCAGCTAGG GTATACGGAT GCATTGTAG ATGCTACAAC 300
 Hind II 31
 ACAAGAAGCT T Kili 遺伝子

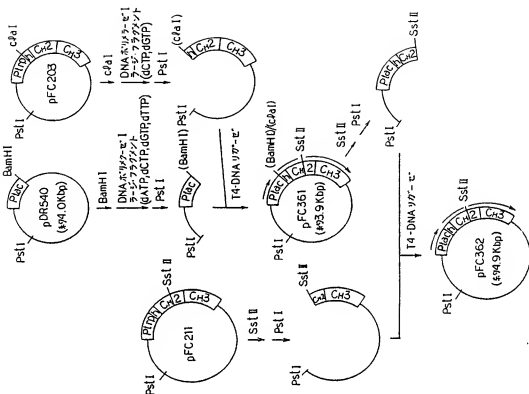
第 7 図



第 8 圖



第 9 図



第 10 図 の (2)

第 10 図 の (1)

固体
 10 ml、20% ショ糖、50 mM Tris-HCl
 (pH 8.0)、1 mM EDTA、懸濁、氷浴上
 50 ml ポリアクリレン懸濁心管
 2 ml、0.25 M EDTA
 1 ml、リゾチム (5 mg/ml、0.025 M
 Tris-HCl (pH 8.0))
 0.1 ml、リボスクレアゼ A (10 mg/ml)
 溶液 ゆるやかに混合、氷浴上 15分～30分放置。
 5 ml、3×トリトン X-100、ゆるやかに
 混合、
 氷浴上 15分～45分放置。
 遠心分離 17,000r.p.m.、4℃、40分
 上澄液
 250 ml ガラスびん
 2/3 倍容量の蒸留水 (2回蒸留)
 2/3 倍容量の冷たい水飽和フェノール、ゆる
 やかに混合。
 遠心分離 6,500r.p.m.、4℃、15分

上層
 等量のフェノール；クロロホルム
 遠心分離 6,500r.p.m.、4℃、15分
 上層
 1/25倍容量の 5M NaCl
 2倍容量のエタノール、-20℃で1晩放置
 遠心分離 6,500r.p.m.、-20℃、60分
 DNAペレット、過剰の液体を乾燥
 5 ml A-50バッファーに再溶解
 1 ml 滅菌80%グリセロール、ゆるやかに混合
 A-50カラム (2×35cm、1フラクション
 = 4 ml)
 DNA分画 (A...ピーク)
 2倍容量のエタノール、-20℃で1晩放置

第 10 図 の (3)

遠心分離 6500r.p.m. -20℃、60分

DNAベレツト

2.1 ml TENバッファ (20mM Tris - HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 1mM EDTA) (5ml 精製セルロース管)

2.2 g 炭化セシウム混和 (増状態に保持)

150 μ l PbI (2mg/ml) よく混合する。

2 ml 炭化物

CsCl グラジエント遠心分離、36,000r.p.m. 20℃、40時間

UVで観察

上方バンド: 染色体ニックDNA

下方バンド: 共有結合した閉環状プラスミドDNA

下方バンドのDNAを調々、ぬめる。

グウエックス50W-X8カラム (UVで検出)

(増状態に保持)

第 10 図 の (4)

透析 (10mM Tris - HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 2~4℃、4℃ - 晩)

30 ml コルテックス遠心管

1/25 倍容量の 5M NaCl

2 倍容量のエタノール、-20℃で一晩放置

遠心分離 6,500r.p.m. -20℃、60分

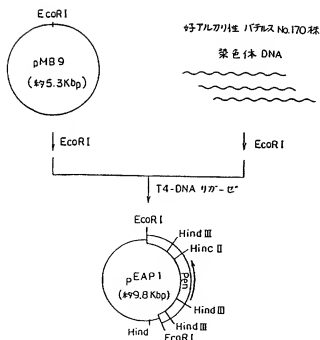
DNA沈殿

1~2 ml TENバッファ

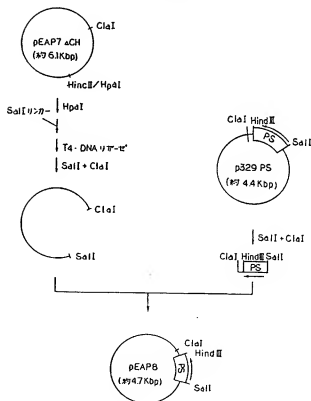
精製プラスミドDNA (1mg/培養物 1ml)

-20~-70℃で貯蔵

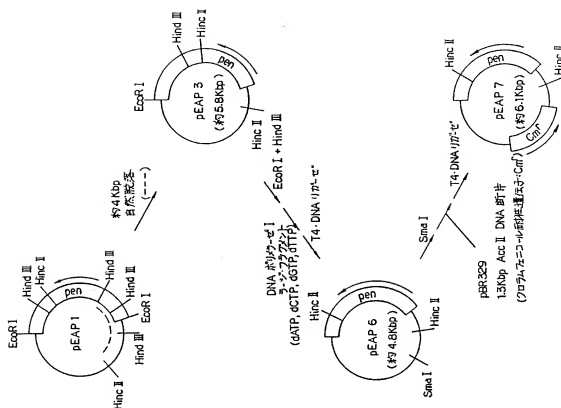
第 11 図



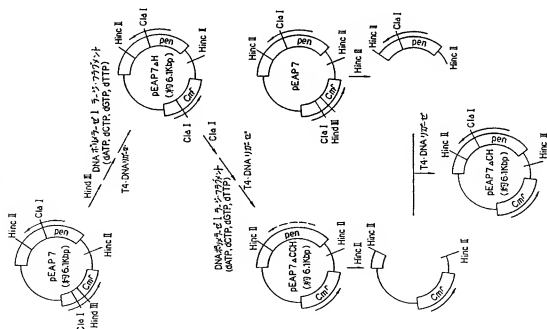
第 14 図



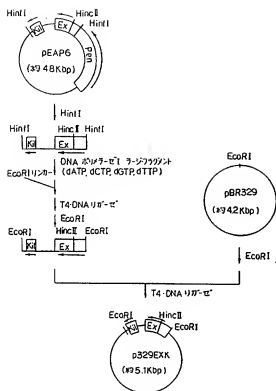
第 12 図



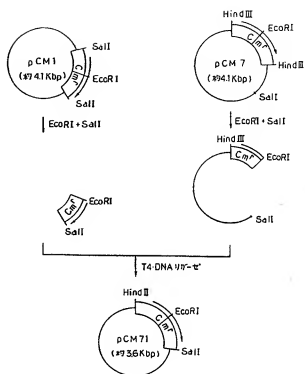
第 13 図



第 15 図



第 16 図



第 17 図

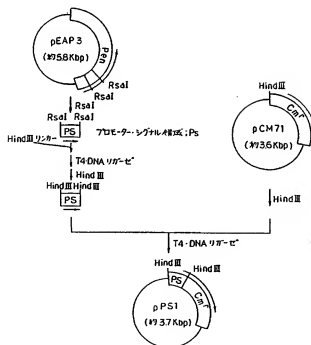


図 18

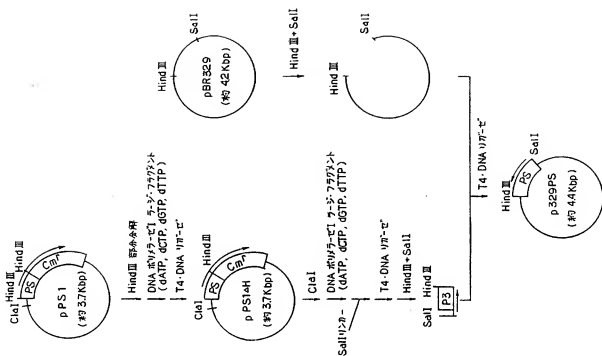
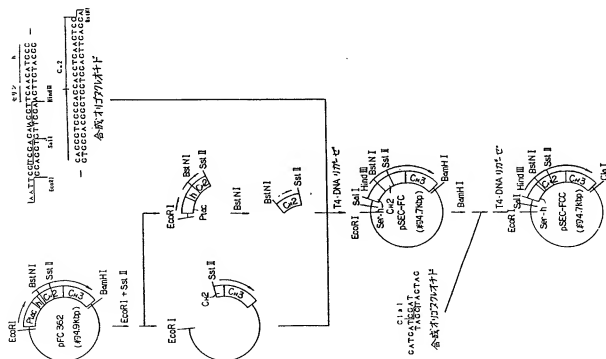
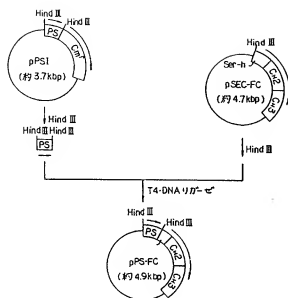


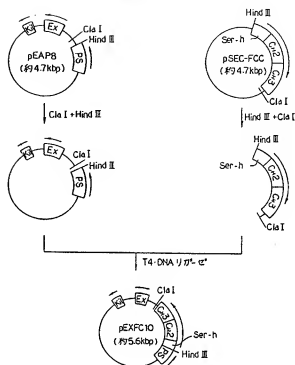
図 19



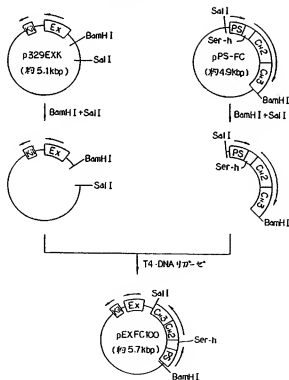
第 20 図



第 21 図

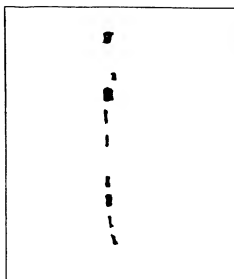


第 22 図



図面の浄書(内容に変更なし)

第 23 図



細胞質	}	エシェリヒア・コリC600株
ペリアラズム		[pFC362]
天然型Fc領域蛋白質		
細胞質	}	エシェリヒア・コリHB101株
ペリアラズム		[pPS-FC]
細胞質	}	エシェリヒア・コリHB101株
ペリアラズム		[pEXFC100]
菌体外		
細胞質	}	エシェリヒア・コリHB101株
ペリアラズム		[pEXFC10]
菌体外		

手続補正書(方式)

昭和61年6月9日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

特願昭61-43531号

2. 発明の名称

新規アラスミド、微生物細胞及びヒト免疫
グロブリンG Fc領域蛋白質の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人 〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士(7260) 有我 軍一郎

電話 370-2470

方式
特許



5. 補正命令の日付(発送日)

昭和61年5月7日

(発送日: 昭和61年5月27日)

6. 補正の対象

図面。

7. 補正の内容

第23図を別紙の通り鮮明に描いたものに補正す
る(内容に変更なし)。

以上

手続補正書 (自発)

昭和61年8月13日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

特願昭61-43531号



2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫
グロブリンG Fc領域蛋白質の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人 〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士(7260) 有我 軍 一 郎

電話 370-2470



あるのを、「PstIで切断し」と補正する。

09 同第45頁第20行目に「一部を含む。」とあるのを、「一部を含む。」と補正する。

08 同第55頁第18行目に「行い、」とあるのを、「行ない、」と補正する。

07 同第56頁第16行目から第17行目に「また先に得られた」とあるのを、「また、先に得られた」と補正する。

06 同第63頁第14行目に「断片を末端を」とあるのを、「断片を、末端を」と補正する。

05 同第64頁第9行目に「クロラムフェニコールを耐性」とあるのを、「クロラムフェニコール耐性」と補正する。

04 同第65頁第10行目に「(約3.7 Kbp) をを作成した。」とあるのを、「(約3.7 Kbp) を作成した。」と補正する。

03 同第67頁第15行目に「相当する。第19図」とあるのを、「相当する第19図」と補正する。

02 同第74頁第16行目から第18行目に「ペルオキシダーゼ標識抗体を……(バイオ・ラッド) によ

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄および図面。

6. 補正の内容

- (1) 明細書第15頁第12行目に「Fc領域遺伝子」とあるのを、「Fc領域遺伝子」と補正する。
- (2) 同第16頁第16行目に「I₀₀プロモーター等」があげられるが」とあるのを、「I₀₀プロモーター等」があげられるが」と補正する。
- (3) 同第25頁第10行目に「炭素源窒素源」とあるのを、「炭素源、窒素源」と補正する。
- (4) 同第27頁第16行目に「Alg」とあるのを、「Arg」と補正する。
- (5) 同第30頁第4行目に「連結を行い」とあるのを、「連結を行ない」と補正する。
- (6) 同第31頁第15行目に「amHI」とあるのを、「amHI」と補正する。
- (7) 同第38頁第3行目から第4行目に「アマーシヤム製」とあるのを、「アマーシヤム製」と補正する。
- (8) 同第39頁第9行目に「PstIを切断し」と

り」とあるのを、「ペルオキシダーゼ標識抗体を用いたイミュノ・プロット・アッセイ・キット(バイオ・ラッド) により」と補正する。

07 同第78頁第6行目に「pFC329の」とあるのを、「pFC362の」と補正する。

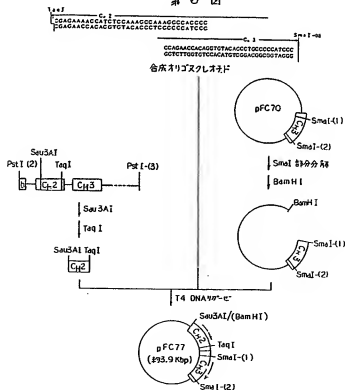
06 明細書に添付した第1図の(1)、第6図、第7図、第9図、第11図、第18図、第20図および第22図を別紙のとおり補正する。

以上

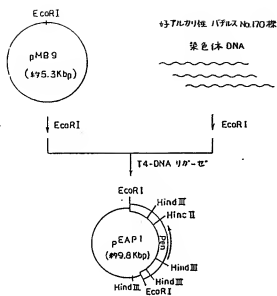
第 1 図 の (1)

ACGCTTTTITTTGTTAATTACATAAAAGTATGCAAA
TGAAGATGGAACAACATTTGAGATGAATTTCTAATATAGGTAATAACTATTTAGC
TTGAAAGAAAGGGTTGATAACATG-AAA-⁽¹⁾AAG-AAT-ACG-TTC-TTA-AAA-GTA-
MET-Lys-Lys-Asn-Thr-Leu-Leu-Lys-Val-
GGA-TTA-TGT-GTA-AGT-TTA-CTA-⁽²⁾GAA-ACA-ACT-CAA-TTT-GTT-AGC-
Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
ACG-ATT-TCT-TCT-GTA-⁽³⁾CAA-GCT-TCA-ACA-TGC-⁽¹⁰⁰⁾CCA-CCG-TGC-CCA-
Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
GGA-CCT-GAA-CTC-CTG-CGG-GGA-CCG-TCA-GTC-TTC-CTC-⁽¹⁵⁰⁾TTC-CCC-
Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-
CCA-AAA-CCC-AAG-GAC-ACC-CTC-ATG-ATC-TCC-CGG-ACC-CCT-GAG-
Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-MET-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-
GTC-⁽²⁰⁰⁾ACA-TGC-GTG-GTG-GTG-GAC-GTG-AGC-CAC-GAA-GAC-CCT-GAG-
Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-
GTC-AAG-TTC-AAC-TGG-TAC-GTG-GAC-GGC-GTG-GAG-GTG-CAT-AAT-
Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
GCC-AAG-ACA-AAG-CCG-CGG-CAG-GAG-CAG-TAC-AAC-AGC-ACG-TAC-
Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-

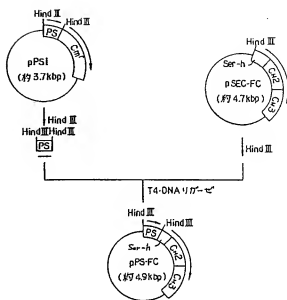
第 6 図



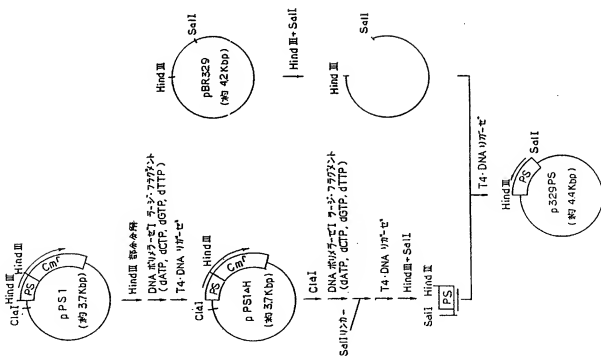
第 11 図



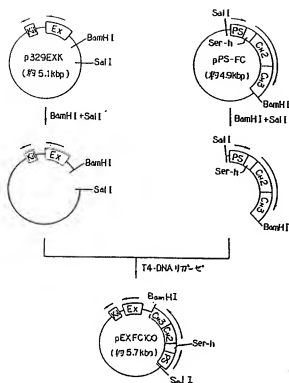
第 20 図



第 18 図



第 22 図



5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄、「図面の簡単な説明」の欄および図面。

6. 補正の内容

- (1) 明細書第7頁第2行に「結ばれている。」とあるのを「結ばれた二量体構造をとっている。」に訂正する。
- (2) 同第9頁第2行に「ついた状態で」とあるのを「結合した状態で」に訂正する。
- (3) 同第10頁下から第1行に「成功し、本発明を」とあるのを「成功し、更にそのFc領域蛋白質の大部分はジスルフィド結合を介した二量体構造を有していることを見出し、本発明を」に訂正する。
- (4) 同第26頁下から第3行に「有無」とあるのを「有無およびその会合の状態」に訂正する。
- (5) 同第27頁第1行～第2行「確認できる。」のあとに次の文を挿入する。
「各画分からのヒトIgG-Fc領域蛋白質の精製は公知の通常知られている蛋白質の分離・精製

昭和61年12月5日

特許庁長官 黒田明雄 殿

1. 事件の表示

特願昭61-43531号

2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンG-Fc領域蛋白質の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人..〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士(7260) 有我軍一郎

電話 370-2470

法に従えばよいが、抗ヒトIgG-Fc成分抗体を用いたアフィニティカラム、クロマトグラフィーがとりわけ有利である。こうして得られたFc領域蛋白質精製品について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量解析、アミノ酸組成分析およびアミノ末端のアミノ酸配列解析を行なうことにより、シグナルペプチドが正しく切断されたFc領域蛋白質の分泌が確認できる。」

(6) 同第28頁下から第4行「ドデシル硫酸ナトリウム」のあとに次の文を挿入する。

「また、特に明示しなければ、微生物細胞が産生したヒト免疫グロブリンG-Fc領域蛋白質には、その単量体蛋白質以外に、二量体等の多量体蛋白質も含まれるものとする。」

(7) 同第73頁下から第4行に「両画分」とあるのを「各画分」に訂正する。

(8) 同第75頁第1行に「免疫」とあるのを削除する。

(9) 同第75頁下から第7行～下から第2行に「ま

た、天然型 Fc 領域……ものと思われる。」とあるのを「また、固体外面分をアセトン乾燥した後、Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8)、SDS グリセロールをそれぞれ最終濃度 60 mM、2%、10% になるように加えて、SDS-ポリアルリルアミドゲル電気泳動 (分離用ゲル濃度 12.5%) を行った。上記と同様な手法により、ヒト IgG Fc 領域蛋白質を特異的に染色した結果の一部を複写して、第 24 図に示した。この際に、後期参考文献記載の方法により調製した。天然型ヒト IgG Fc 領域蛋白質も同一の SDS-ポリアルリルアミドゲルで電気泳動等を行った。

第 24 図より、Fc 領域遺伝子固体外分泌発現型プラスミド pEXFC10 を有するエシェリヒアコリ HB101 株が固体外に分泌した Fc 領域蛋白質は、その大部分が天然型 Fc 領域蛋白質と同様のジスルフィド結合を介した二量体構造をとっていることがわかる。

実施例 21 (分泌 Fc 領域蛋白質の精製)

3 ml の陽性型アフィニティー支持体アフィ

ゲル 10 (バイオ・ラッド) と 6.2 mg のアフィニティー精製ヒツジ抗ヒト IgG-Fc 成分抗体 (カッペル) とを、0.1 M MOPS バッファー (pH 7.5、半井化学製品) 中でカップリングさせて、ヒト IgG Fc 領域蛋白質精製用アフィニティー・カラムを作成した。4℃ で 2 時間カップリングを行ったところ、用いたヒツジ抗ヒト IgG-Fc 成分抗体の約 40% が支持体上に固定化された。

前記実施例 20 で調製した Fc 領域遺伝子固体外分泌発現型プラスミド pEXFC10 を有するエシェリヒアコリ HB101 株培養物の固体外面分の蛋白質を上記アフィニティー・カラムに通し、Fc 領域蛋白質のみを特異的にカラムに吸着させた。カラムを PBS バッファー [100 mM リン酸バッファー (pH 7.4)、140 mM NaCl] 及び 500 mM NaCl を含む 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で充分洗浄した後、0.1 M グリシン-HCl バッファー (pH 2.3) を用いて、Fc 領域蛋白質を溶出させた。溶出した Fc 領域蛋白質を水に対して透析し、凍結乾燥した後に、実施例 20

の方法に準じて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (分離用ゲル濃度 12.5%) を行なった。電気泳動終了後、ゲル中の蛋白質のバンドを銀染色試薬 (第一化学製品) を用いて染色したところ、98% 以上の純度の大幅固体外分泌 Fc 領域蛋白質が得られたことが確認できた。

実施例 22 (分泌 Fc 領域蛋白質の解析)

前記実施例 21 で得られた大幅固体外分泌 Fc 領域蛋白質精製品を、気相アミノ酸分析用試薬 (アブライド、バイオシステムズ、モデル 470 A) にかけて、アミノ酸末端のアミノ酸配列解析を行ったところ、

H₂N-Ser-Thr-()-Pro-Pro
-()-Pro-……

という結果が得られた。この結果はベニシラーゼのシグナルペプチドが分泌の際に正しく切断されたことを示すものである。また、分泌 Fc 領域蛋白質精製品を 2% チオグリコール酸を含む 6 N HCl 中に 110℃ で 22 時間保つことによって加水分解した後、アミノ酸分析計 (日立 835 型)

を用いたアミノ酸組成分析を行ない下記の結果が得られた。

アミノ酸	計算値 (モル%)	実験値 (モル%)
Asn / Asp	8.93	8.84
Thr	6.70	6.16
Ser	9.36	8.82
Gln / Glu	11.16	11.83
Gly	4.46	5.12
Ala	3.12	3.59
Val	10.27	9.45
Cys	2.68	2.57
Met	1.34	1.41
Ile	1.79	1.88
Leu	7.59	7.84
Tyr	4.02	4.07
Phe	3.12	3.22
Lys	8.48	8.66
His	2.68	2.73
Arg	2.68	2.81
Pro	9.82	9.65
Trp	1.79	1.33
合 計	100.00	100.00

遺伝子の塩基配列より類推した計算値が実験値とよく一致していることから、大幅固体外分泌した Fc 領域蛋白質は計画通りのものであることがわかる。更に、天然型 Fc 領域蛋白質の分子量が約 5000 ダルトン程度小さいという第 23 図の結

果から考えて、大腸菌が菌体外に分泌したFc領域蛋白質には糖鎖の付加は起こっていないものと思われる。」に訂正する。

04 同第76頁第4行～第5行に「(100 mMリン酸バッファー (pH7.4)、140 mM NaCl)」とあるのを削除する。

05 同第79頁下から第3行の次に次の文を挿入する。

「第24図は、Fc領域蛋白質の構造確認結果を示したものである。」

06 図面の第24図を追加する。

以上

第 24 図

